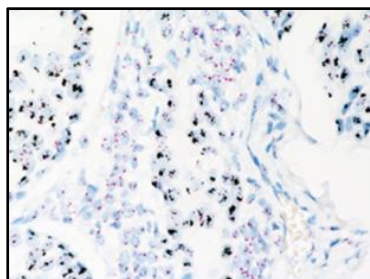


VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail

REF 800-6043

08314373001

IVD 30



Obr. 1. Stanovení stavu amplifikace HER2 s testem VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail, karcinom prsu.

URČENÉ POUŽITÍ

Test VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail je určen ke stanovení stavu genu *HER2* vyčíslením poměru genu *HER2* k chromozomu 17 světelnou mikroskopií. Sondy *HER2* a chromozome 17 jsou detekovány s použitím dvoubarevné chromogenní hybridizace in situ (ISH) ve vzorcích tkáně lidského karcinomu prsu a žaludku fixovaných formalinem, zalitých parafínem, včetně gastroezofageální junkyce, po barvení na přístrojích BenchMark IHC/ISH.

Test VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail je indikován jako pomůcka při posuzování pacientů, pro něž se zvažuje nasazení přípravku Herceptin (trastuzumab). Tento produkt musí být interpretován kvalifikovaným patologem v kombinaci s histologickým vyšetřením, relevantními klinickými informacemi a správnými kontrolami. Tento produkt je určen pro diagnostické použití in vitro (IVD).

SOUHRN A VYSVĚTLENÍ

Lidský receptor epidermálního růstového faktoru 2 (*HER2*) je členem podrodiny epidermálního růstového faktoru transmembránových tyrozin kinázových receptorů, které zprostředkovávají růst, diferenciaci a přežití buněk.^{1,2} Přibližně 15 až 30 procent karcinomu prsu vykazuje nadměrnou expresi proteinu *HER2*, amplifikaci genu *HER2* (*ERBB2*) nebo obojí.^{3,4} Znalost stavu genu *HER2* a/nebo proteinu u invazivního karcinomu prsu umožňuje lékařům činit informovanější rozhodnutí ke zlepšení celkové péče o tyto pacienty.⁵ Stav *HER2* je zavedeným prediktivním faktorem pro odpověď na terapii cílenou na *HER2* u pacientů s rakovinou prsu.^{5,6,7}

Trastuzumab (Herceptin) je humanizovaná monoklonální protilátka proti extracelulární doméně *HER2* a byl prokázán její prospěch pro pacienty s rakovinou prsu pozitivním na *HER2*.⁸⁻¹³ Demonstrování genové amplifikace a / nebo nadměrné exprese proteinu *HER2* má zásadní důležitost pro výběr pacientů pro léčbu trastuzumabem.^{5,14}

Podobně dochází ke genové amplifikaci *HER2* nebo k nadměrné expresi proteinu u adenokarcinomu žaludku a gastroezofageální junkyce (souhrnně označované jako gastroezofageální adenokarcinom neboli GEA).^{15,16,17} Ve zveřejněných studiích byla hlášena široká škála četnosti nadměrné exprese *HER2*. Jeden z největších datových souborů ze screeningů, který zahrnoval 3803 pacientů s GEA, však uvedl, že 22 procent pacientů mělo pozitivní test na expresi nebo genovou amplifikaci proteinu *HER2*.¹⁸ Většina studií naznačuje, že při absenci léčby zaměřené na *HER2* je nadměrná exprese *HER2* negativním prognostickým faktorem.¹⁹

Trastuzumab s terapií zacílenou na *HER2* je ústředním pilířem při léčbě invazivního karcinomu prsu a má terapeutickou hodnotu při léčbě pacientů s rakovinou žaludku / GEA, kteří nadměrně exprimují receptor.^{15,17} Prokázání genové amplifikace a / nebo nadměrné exprese proteinu *HER2* je nezbytná pro výběr pacientů pro léčbu trastuzumabem.^{15,19} Klinické studie ukázaly, že z léčby trastuzumabem mají největší prospěch pacienti s rakovinou prsu nebo žaludku/GEA s vysokou nadměrnou expresí proteinu a/nebo genovou amplifikací *HER2*.^{3,15}

PRINCIP POSTUPU

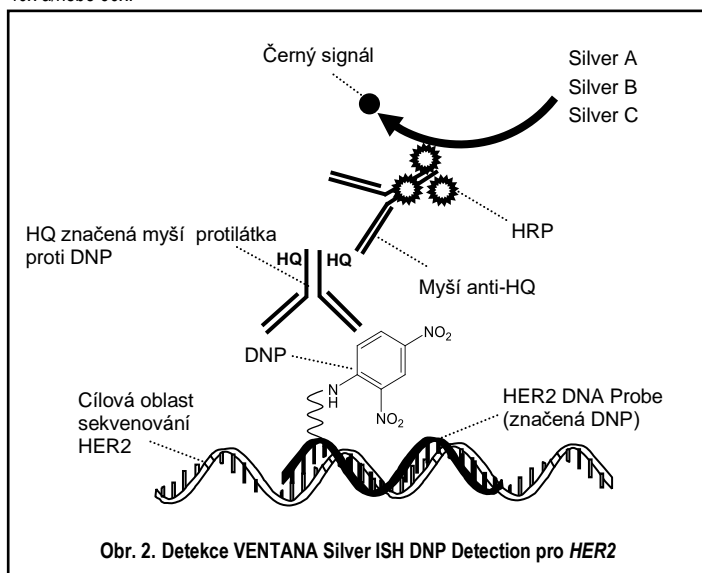
Test VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail obsahuje sondy *HER2* (označené hapténovým dinitrofenylem neboli DNP) a sondy Chromosome 17 (označené hapténovým digoxigeninem neboli DIG) formulované v pufru na bázi formamidu. Sondy jsou určeny k detekci amplifikace genu *HER2* v invazivním karcinomu prsu a GEA. Sonda *HER2* DNA Probe je směsí oligosond, specificky cílených na gen *HER2* (také známý jako *ERBB2*

a *NEU*), který je umístěn na lidském chromozomu 17 (17q12). Sonda chromozomu 17 je směsí oligosond cílených na sekvence v centromerické oblasti a slouží jako reference pro aneusomii. Počet kopií obou sond je vyčíslen v jádrech nádorů a výsledky jsou hlášeny jako poměr *HER2* / chromozom 17 pro stanovení stavu amplifikace *HER2* (poměr *HER2* / chromozom 17 ≥ 2.0 znamená amplifikováno, zatímco poměr < 2.0 znamená neamplifikováno). Koktejl VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail má optimální složení pro použití s detekční soupravou VENTANA Silver ISH DNP Detection Kit, VENTANA Red ISH DIG Detection Kit a pomocnými reagensii na přístroji BenchMark IHC/ISH.

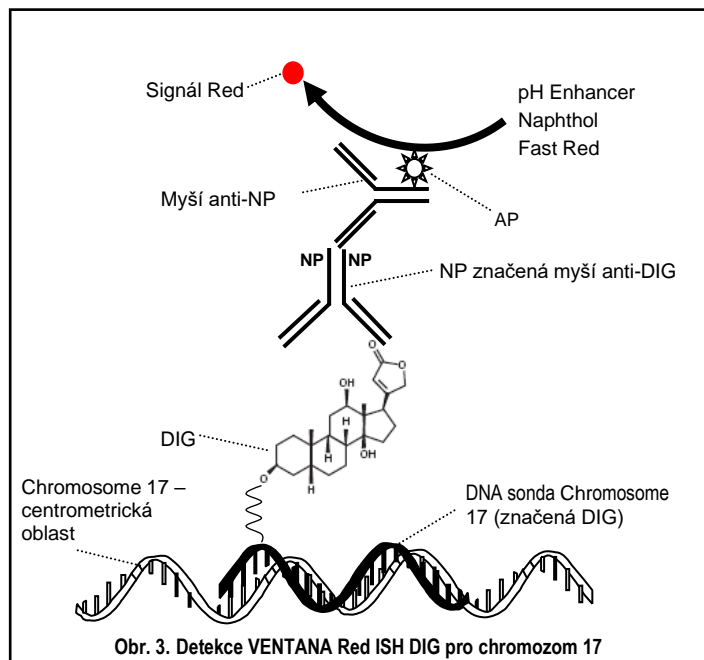
Detekční souprava obsahuje primární protilátku a enzymem značenou sekundární protilátku konjugovanou na křenuvou peroxidázu (HRP) nebo alkalickou fosfatázu (AP), používanou jako chromogenní DNP a DIG kohybridizovány na jejich příslušné specifické cílové sekvence DNA s buněčnými jádry. Detekce sondy *HER2* značené DNP se uskuteční nejprve s použitím detekční soupravy VENTANA Silver ISH (SISH) DNP Detection Kit obsahující následující dávkačce: myši primární anti-DNP protilátky značené hydroxychinoxalinem (HQ), myši anti-HQ sekundární protilátky konjugované křenuvou peroxidázu (HRP), chromogenu Chromogen A (Silver A), Chromogen B (Silver B) a Chromogen C (Silver C). Po inkubaci s HQ značenou myši primární protilátkou proti DNP a poté konjugátem myši anti-HQ HRP sekundární protilátkou, dojde k reakci SISH. Stručně řečeno, tato reakce je řízena postupným přidáváním chromogenu A (octan stříbrný), B (hydrochinon) a C (H_2O_2). Zde stříbrné ionty (Ag^+) jsou redukovány hydrochinonem na atomy kovového stříbra (Ag^0). Tato reakce je poháněna substrátem pro HRP, peroxidem vodíku (Chromogen C). Stříbrný precipitát se ukládá v jádrech a jednotlivá kopie genu *HER2* je vizualizována jako černá tečka. Reakce SISH je znázorněna na Obr. 2.

Po detekci SISH pro *HER2* je sonda chromozomu 17 značená DIG detekována s použitím detekční soupravy VENTANA Red ISH DIG Detection Kit. Tato souprava obsahuje následující dávkačce: myši primární anti-DIG protilátky značené nitropyrazolem (NP), myši anti-NP sekundární protilátky konjugované alkalickou fosfatázou (AP), zesilovače pH Enhancer, naftolu Naphthol a reagentie Fast Red. Po vývoji signálu SISH je skličko inkubováno s myši anti-DIG primární protilátkou značenou NP, která se váže na haptén DIG na sondě chromozomu 17. Anti-hapténová primární protilátka je detekována s myši anti-NP konjugovanou s enzymem AP. Skličko je inkubováno s roztokem pH Enhancer, který poskytuje správné složky soli a koncentrace a pufované pH pro optimální výkon enzymu AP. Dále se použije naftol fosfát, který slouží jako substrát pro enzym AP (AP defosforyluje naftol). Reagentie Fast Red, přidaná na další skličko, se spojí s defosforylovaným naftolem a vytvoří červený precipitát, který lze snadno vizualizovat světelnou mikroskopií. Obr. 3 znázorňuje reakci Red ISH. Za účelem interpretace pomocí světelné mikroskopie je vzorek poté kontrastně nabarven reagentií Hematoxylin II.

Barvicí protokol se skládá z četných kroků, v nichž jsou reagentie inkubovány po předem určené doby při specifických teplotách. Na konci každého inkubačního kroku přístroj BenchMark IHC/ISH řezy promyje, čímž odstraní nenavázaný materiál, a nanese kapalnou krycí skličko, které minimalizuje odpařování vodních reagentií z podložního sklička. Výsledky jsou interpretovány s použitím světelného mikroskopu s použitím objektivů 20x, 40x a/nebo 60x.



Obr. 2. Detekce VENTANA Silver ISH DNP Detection pro HER2



DODÁVANÝ MATERIÁL

Dávkač koktejlu VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail obsahuje dostatek reagentů pro 30 testů.

Jeden 6mL dávkač koktejlu VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail obsahuje přibližně 14 µg/mL sond HER2 značených dinitrofenylem (DNP) a 0.24 µg/mL sond Chromosome 17 značených digoxigeninem (DIG), formulovaných v hybridizačním pufru na bázi formamidu. Obě sondy se používají ke stanovení stavu genu *HER2* (tzn. poměru *HER2*/chromozom 17).

Podrobné popisy následujících položek naleznete v příslušném metodickém listu v detekční soupravě VENTANA: Principy postupu, Materiály a metody, Odběr vzorků a příprava pro analýzu, Postupy kontroly kvality, Řešení problémů, Interpretace výsledků a Omezení.

POTŘEBNÉ MATERIÁLY, KTERÉ NEJSOU SOUČÁSTÍ DODÁVKY

Barvicí reagentie, jako jsou detekční soupravy a pomocné komponenty VENTANA, se nedodávají.

Všechny produkty uvedené v metodickém listu nemusejí být dostupné ve všech zeměpisných oblastech. Obráťte se na místní servisní zastoupení.

Následující reagentie a materiály potřebné pro barvení nejsou součástí dodávky:

1. VENTANA Silver ISH DNP Detection Kit (kat. č. 760-516 / 08318883001)
2. VENTANA Red ISH DIG Detection Kit (kat. č. 760-512 / 08318832001)
3. HybReady Solution (kat. č. 780-4409 / 05917557001)
4. ISH Protease 3 (kat. č. 780-4149 / 05273331001)
5. Hematoxylin II (kat. č. 790-2208 / 05277965001)
6. Bluing Reagent (kat. č. 760-2037 / 05266769001)
7. Reaction Buffer Concentrate (10X) (kat. č. 950-300 / 05353955001)
8. SSC (10X) (kat. č. 950-110 / 05353947001)
9. EZ Prep Concentrate (10X) (kat. č. 950-102 / 05279771001)
10. *ultraView* Silver Wash II (Pre-dilute) (kat. č. 780-003 / 05446724001)
11. Cell Conditioning Solution (CC1) (kat. č. 950-124 / 05279801001)
12. Cell Conditioning Solution (CC2) (kat. č. 950-123 / 05279798001)
13. LCS (Predilute) (kat. č. 650-010 / 05264839001)
14. ULTRA LCS (Pre-dilute) (kat. č. 650-210 / 05424534001)
15. ULTRA Cell Conditioning Solution (ULTRA CC1) (kat. č. 950-224 / 05424569001)
16. ULTRA Cell Conditioning Solution (ULTRA CC2) (kat. č. 950-223 / 05424542001)
17. Přístroj BenchMark IHC/ISH

18. Mikroskopická skříčka, kladně nabitá (Superfrost Plus nebo ekvivalent)
19. Trvalé fixační médium*
20. Krycí skříčko dostatečné k pokrytí tkáně
21. Automatizovaný podavač krycích skříček
22. Skříčka HER2 Dual ISH 3-in-1 Xenograf Slides (kat. č. 783-4422 / 05640300001) lze v případě potřeby použít k řešení problémů.

* Fixační média, která jsou s tímto testem kompatibilní, jsou uvedena v Tab. 30.

SKLADOVÁNÍ A STABILITA

Po přijetí a mezi použitím uchovávejte při teplotě 2–8 °C. Nezmrazujte.

Aby byla zajištěna správná funkčnost reagentie a stabilita sondy, musí se dávkač po každém použití uzavřít víčkem a okamžitě umístit ve svislé poloze do chladničky.

Každý dávkač sondy má stanovenou dobu expirace. Při řádném skladování zůstane reagentie stabilní do data uvedeného na štítku. Po uplynutí data expirace reagentii nepoužívejte.

PŘÍPRAVA VZORKŮ

Pro použití této sondy na přístroji BenchMark IHC/ISH jsou vhodné tkáně zpracované běžným způsobem, fixované formalinem, zalité parafinem (FFPE). Doporučeným fixativem na tkáně je 10 % neutrální pufovaný formalin (NBF) po dobu 6 až 72 hodin.²⁰ Kromě testů VENTANA bylo ve studiích zjištěno, že většina neprůkazných výsledků pro gen *HER2* stanovených metodou FISH souvisela s preanalytickými faktory, včetně nedostatečné a nadměrné fixace²¹ a rovněž opožděné fixace²². Striktní implementace postupů fixace (např. vyhrazený procesor k zajištění minimální fixace) měla za následek 68.5 % snížení neprůkazných případů z 10.8 % selhání na 3.4 %. V případě vzorků fixovaných < 6 hodin ve formalínu může docházet ke ztrátě signálu a k nadměrné digesci v jádře, pozorované jako bledé / slabé barvení hematoxylinem. Doporučuje se pouze fixace v 10 % NBF, protože některá fixativa produkují proměnné zbarvení v testech na bázi ISH (včetně Bouinovy kapaliny (Bouin's) a Alcohol Formalin-Acetic Acid (alkohol-formalin-kyselina octová, AFA)).²¹

Skříčka je třeba obarvit okamžitě, protože kvalita cílů nukleových kyselin v připravených tkáňových řezech se může postupem času snižovat. Interní studie prokázaly, že skříčka s řezy prsu a žaludku skladovaná při 2–8 °C mohou být stabilní po dobu 12 měsíců. Kladně nabitá skříčka mohou být citlivá na zátěž prostředí, což má za následek nevhodné zbarvení u jakéhokoliv testu ISH (například absence barvení nebo kontrastního barvení tkáně). Požádejte zástupce společnosti Roche o kopii dokumentu „Impact of environmental stress on various histology slide types“, abyste lépe porozuměli tomu, jak tyto typy sklíček používat.

Každý řez musí být odříznut na patřičnou tloušťku (4 µm) pro použitý test a umístěn na kladně nabitě mikroskopické podložní skříčce (Superfrost Plus nebo ekvivalent). Skříčka je třeba odvodnit, respektive je vysušit a odstranit přebytečnou vodu nacházející se mezi sklíčkem a tkání.

Řezy silnější než 4 µm mohou vyžadovat silnější ošetření proteázou, než je doporučený stav, a mohou v důsledku nadměrného množství parafinu v tkáni vykazovat více bublin v jádru než tenčí řezy. Tvorba bublin v jádrech se projevuje jako velké či malé bubliny nebo vakuoly v jádrech. Často, když dojde ke vzniku bublin v jádře, má to celé spektrum účinků na signály SISH a Red ISH, charakterizované 1) jádry s bublinami v jádrech, v nichž jsou signály SISH a Red ISH obecně ještě umístěny ve středu jádra, a 2) jádry s bublinami v jádrech, které vytlačují signály SISH a Red ISH na okraj. Často v obou případech, pokud jsou signály SISH a Red ISH jasně rozpoznatelné, nejsou jinak zkrleslé, jsou ještě vyčísitelné a případ lze hodnotit. V některých případech však může silná přítomnost bublin v jádře signály SISH a Red ISH zkrleslovat nebo je činit nerozpoznatelnými tak, že přesné vyčíslení není možné. Dochází k tomu častěji, když jsou signály SISH a Red ISH vytlačovány na okraj jádra. Pokud k tomu dojde, může se stát, že bude možné jádra, která jsou vyčísitelná, pozorovat kdekoli ve vzorku, a případ lze hodnotit. Pokud je v jádře silný výskyt bublin do té míry, že není možné najít dostatek jader, ve kterých lze signály SISH a Red ISH spolehlivě vyčíslit, nelze takový případ vyhodnotit. Bubliny v jádře se také mohou tvořit v souvislosti s nedostatečnou fixací (1–3 hodiny s formalinem), což představuje méně diskretní bubliny v jádře. Lze to napravit 3hodinovou fixací se změněnou úpravou buněk / ošetřením proteázou, avšak za 1 hodinu není pravděpodobně možné dosáhnout patřičné nápravy.

Test VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail byl vyvinut s dalšími možnostmi předběžného ošetření, které mohou pomoci optimalizovat test v různých laboratořích a pro následně řešení problémů s určitými tkáněmi / sklíčky vykazujícími suboptimální barvení. Je doporučeno, aby každá laboratoř provedla počáteční cykly na reprezentativních kontrolních vzorcích, které byly připraveny za identických podmínek jako klinické vzorky,


kteří mají být testováni. To pomůže optimalizovat specifické podmínky barvení pro jednotlivé laboratoře, které se mohou ve svých přesných postupech přípravy vzorků lišit. Proměnlivé výsledky mohou nastat při jiných preanalytických faktorech, než je doporučeno. Vzorky, které jsou preanalyticky připraveny s použitím nedoporučovaných podmínek, nemohou být v testu nikdy správně obarveny.

VAROVÁNÍ A BEZPEČNOSTNÍ OPATŘENÍ

1. Určeno k diagnostickému použití in vitro (IVD).
2. Pouze k odbornému použití.
3. Nepoužívejte nad rámec specifikovaného počtu testů.
4. **Varování, produkt obsahuje formamid.** Formamid je toxický při vdechování a středně toxický při požití. Dráždí kůži, oči, a sliznice a je absorbován skrz kůži. Může způsobit poškození nenarozeného dítěte. Při manipulaci s reagenty dodržujte přiměřená bezpečnostní opatření. Při manipulaci s možnými karcinogeny nebo toxickými materiály používejte jednorázové rukavice a vhodný ochranný oděv.
5. S materiálem lidského nebo živočišného původu je třeba nakládat jako s potenciálně nebezpečným biologickým materiálem a likvidovat jej v souladu s platnými bezpečnostními opatřeními. V případě expozice je potřeba se řídit zdravotnickými směnicemi odpovědných orgánů.^{23,24}
6. Zabraňte kontaktu reagentů s očima a sliznicemi. Jestliže se reagenty dostanou do kontaktu s citlivými oblastmi, omýjte zasažené oblasti vydatným množstvím vody. Zabraňte vdechování reagentů.
7. Před spuštěním cyklu přístroje zkontrolujte, zda je odpadní nádoba prázdná. Pokud není zavedeno toto bezpečnostní opatření, odpadní nádoba může přetéct a uživatel riskuje uklouznutí a pád.
8. Zabraňte mikrobiální kontaminaci reagentů, mohla by způsobit nepřesnost výsledků.
9. Další informace o používání tohoto prostředku obsahuje uživatelská příručka přístroje BenchMark IHC/ISH a návody k použití všech nezbytných součástí, které naleznete na internetových stránkách navifyportal.roche.com.
10. Doporučené metody likvidace jsou uvedeny v celostátních a/nebo místních předpisech.
11. Označení produktu bezpečnostními štítky se řídí hlavně pokyny GHS EU. Pro profesionální uživatele je na vyžádání k dispozici bezpečnostní list.
12. Pro nahlášení podezřelých závažných incidentů týkajících se tohoto prostředku se obraťte na místního zástupce společnosti Roche a kompetentní orgány členského státu nebo země, ve které uživatel provozuje činnost.

Tento produkt obsahuje součásti klasifikované následovně podle směrnice (ES) č. 1272/2008:

Tab. 1. Informace o rizicích.

Riziko	Kód	Věta
	H351	Podezření na vyvolání rakoviny.
	H360D	Může poškodit plod v těle matky.
	H373	Může způsobit poškození orgánů při prodloužené nebo opakované expozici.
	P201	Před použitím si obzvláště pozorně přečtěte speciální pokyny.
	P202	Nepoužívejte, dokud jste si nepřepčetli všechny bezpečnostní pokyny a neporozuměli jim.
	P260	Nevdechujte mlhu ani páry.
	P280	Používejte ochranné rukavice / ochranný oděv / ochranné brýle / obličejový štít / ochranu sluchu.
	P308 + P313	Při expozici nebo podezření na ni: Vyhledejte lékařskou pomoc/ošetření.
	P501	Odstraňte obsah / obal předáním do schváleného zařízení k likvidaci odpadu.

Produkt obsahuje látku s č. CAS 75-12-7: formamid

POSTUP BARVENÍ

Sondy VENTANA byly vyvinuty pro použití na přístroji BenchMark IHC/ISH společně s detekčními soupravami a příslušenstvím VENTANA. Postupy barvení pro přístroj BenchMark IHC/ISH s detekční soupravou VENTANA Silver ISH DNP Detection Kit a VENTANA Red ISH DIG Detection Kit jsou uvedeny v Tab. 2. Doporučené barvicí protokoly jsou uvedeny v Tab. 3.

Parametry automatických procesů lze zobrazit, vytisknout a upravovat podle postupů uvedených v uživatelské příručce přístroje. Podrobné informace najdete v příslušném metodickém listu v detekční soupravě VENTANA.

Další podrobnosti o správném používání tohoto prostředku najdete v metodickém listu ke vkladacímu dávkovači (P/N 800-6043).

Tab. 2. K provedení testu VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail na přístrojích BenchMark IHC/ISH použijte následující postupy barvení.

Platforma přístroje	Postup barvení
BenchMark GX	GX VENTANA HER2 DISH DNA PRB CKT
BenchMark XT	XT VENTANA HER2 DISH DNA PRB CKT
BenchMark ULTRA nebo BenchMark ULTRA PLUS	U VENTANA HER2 DISH DNA PRB CKT

Tab. 3. Doporučené podmínky barvení pro test VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail na přístrojích BenchMark IHC/ISH.

Podmínky barvení	Prs	Žaludek
Sušení	Nezvoleno	Nezvoleno
Cell Conditioning 1	16 minut	16 minut
Cell Conditioning 2	24 minut	16 minut
ISH Protease 3	20 minut	16 minut
Teplota důkladného promytí	76 °C pro přístroje BenchMark GX/XT	76 °C pro přístroje BenchMark GX/XT
	74 °C pro přístroje BenchMark ULTRA nebo ULTRA PLUS	74 °C pro přístroje BenchMark ULTRA nebo ULTRA PLUS

Vzhledem k různým způsobům fixace a zpracování tkání, jakož i obecnému stavu přístroje a podmínkám laboratorního prostředí může být potřeba prodloužit nebo zkrátit dobu úpravy buněk nebo dobu předběžného zpracování proteázou v závislosti na jednotlivých vzorcích.

Spuštění cyklu na přístrojích BenchMark IHC/ISH

1. Opatřete skříčku štítkem s čárovým kódem, který odpovídá protokolu sondy, který má být proveden.
2. Naplňte koktejl VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail, reagenty z detekčních souprav VENTANA Red ISH DIG a VENTANA Silver ISH DNP Detection Kit a požadované pomocné reagenty do zásobníku reagentů (zásobníků reagentů) nebo karuselu. Dejte zásobník reagentů (zásobníky reagentů) nebo karusel do přístroje.
3. Zkontrolujte velkoobjemové tekutiny a odpad.
4. Velkoobjemové lahve s reakčním pufrem musejí být plné.
5. Odpadní nádoba musí být vyprázdněna před zahájením cyklu.
6. Vložte skříčku do přístroje.
7. Spusťte barvicí cyklus.
8. Po dokončení cyklu odstraňte skříčku z přístroje. Na obarvených skříčkách bude zbytkový puf a kapalný roztok krycího skříčka. Pokračujte v oplachování a dehydrataci (viz níže).

Postup dehydratace

Poznámka: Chromogen Fast Red je rozpustný v alkoholu a v acetonu. Pokud jsou obarvená sklička vystavena působení alkoholu a/nebo acetonu, může to mít za následek ztrátu specifického signálu.

1. Pro odstranění roztoku kapalného krycího sklička promyjte sklička 2krát za sebou v roztocích jemného saponátu na mytí nádobí (nepoužívejte saponát určený pro automatické myčky nádobí).
2. Oplachujte sklička důkladně destilovanou vodou asi 1 minutu. Přebytečnou vodu vytřepajte.
3. Pro usušení vložte sklička do sušárny (45–60 °C) anebo je sušte na vzduchu při teplotě okolí. V sušárně se doba sušení pohybuje od 10 minut do jedné hodiny (sušení obarvených skliček po delší dobu zřejmě nemá na výsledky barvení vliv). Před aplikací krycího sklička do podavače musejí být sklička zcela suchá, protože zbytková voda na skličkách může narušit postup podavače krycích skliček a způsobit tvorbu bublin.
4. Přemístěte sklička do xylenové lázně asi na 30 sekund.
5. Umístěte fixační médium na skličko.
6. Umístěte krycí skličko na podložní skličko. Nezapomeňte, že některá fixační média nejsou s testem kompatibilní a neměla by se používat (viz část Omezení a Řešení problémů).

POSTUPY KONTROLY KVALITY

Pozitivní kontrolní vzorek

Normální signály *HER2* a chromozomu 17 (1 až 2 kopie na buňku) fungují jako vnitřní pozitivní kontroly a musejí být viditelné ve vzorku s použitím objektivů 20x, 40x a/nebo 60x. Z důvodu biologické heterogenity však ne všechny buňky budou vykazovat kopii jediného genu. Specifické jaderné zbarvení může být umístěno v různých buňkách, včetně: stromálních fibroblastů, endoteliálních buněk, lymfocytů a nenádorových epitelálních buněk. Pokud pozitivní kontrola nevykazuje pozitivní barvení, může to znamenat problém s reagentii nebo s přístrojem. Protože každý vzorek má vnitřní pozitivní kontrolu (tzn. patřičné barvení ISH v normálních buňkách), funguje to jako skutečná „pozitivní kontrola“.

Pozitivní kontrolní vzorek specifický pro laboratoř lze použít s každým provedeným postupem barvení. Kontrolní vzorky mohou být vzorky připravené způsobem identickým s patientskými vzorky. Takové kontroly lze použít pro sledování všech kroků postupu, od přípravy vzorků až po barvení. Použití vzorku připraveného odlišně než testovací vzorky poskytne kontrolu pro reagentie, přístroj a postupy, avšak ne pro fixaci a zpracování vzorků. Výsledky s testovacími vzorky mají být analyzovány ve stejném cyklu. Takové kontroly by neměly nahrazovat správné vyhodnocení interních kontrol u každého patientského vzorku.

Vzorky štěpů z cizí tkáně

Sklička Xenograft mohou být užitečná pro předběžné ověření metody použité k barvení skliček s testem VENTANA *HER2* Dual ISH DNA Probe Cocktail. Také se doporučují jako pomůcka pro řešení problémů při použití v cyklech obsahujících klinické vzorky. Další informace najdete v příslušném metodickém listu ke skličkům Xenograft.

Nevyšetřitelné rozpory

Nevyšetřitelné rozpory v kontrolách je třeba neprodleně nahlásit na vaše místní servisní zastoupení. Pokud výsledky kontroly kvality nesplňují specifikace, výsledky pacienta jsou neplatné. Viz část Řešení problémů tohoto metodického listu. Identifikujte a napravte problém a pak opakujte patientské vzorky.

Ověření testu

Před prvním použitím sondy nebo barvicího systému při diagnostickém postupu je třeba ověřit specifitu sondy, a to jejím testováním na řadě tkání se známými ISH funkčními charakteristikami (viz metodický list sondy a doporučení ke kontrole kvality College of American Pathologists Laboratory Accreditation Program, Anatomic Pathology Checklist,²⁵ nebo CLSI Approved Guideline²⁶, případně oba dokumenty). Tyto postupy kontroly kvality je třeba opakovat pro každou novou šarži reagentii nebo vždy, když dojde ke změně parametrů testu.

INTERPRETACE BARVENÍ / OČEKÁVANÉ VÝSLEDKY

Vzor buněčného barvení pro test VENTANA *HER2* Dual ISH DNA Probe Cocktail je jaderný.

Kvalifikovaný patolog se zkušenostmi s mikroskopickou interpretací anatomicko-patologických vzorků, postupy ISH a rozpoznáváním jednotlivých a amplifikovaných kopií

HER2 a chromozomu 17 (Chr17) (vyžadujících mikroskopické zkoumání s použitím objektivů 20x, 40x a/nebo 60x) musí před interpretací výsledků vyhodnotit kontroly.

Poznámka: Použití objektivu 100x se nedoporučuje. Všechna čtení skliček s tkání při ověřování designu a validaci testování byla provedena s použitím objektivů 20x, 40x a/nebo 60x.

Pro interpretaci sklička je nutno použít VENTANA *HER2* Dual ISH DNA Probe Cocktail společně s *Průvodcem interpretací testu VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail* [P/N 1018386].

V následujících částech je popsáno, jak interpretovat a hodnotit sklička. Tab. 4 ilustruje počítání diskretních signálů.

Definice

1. Stav genu *HER2*. Stav genu *HER2* je funkcí poměru počtu kopií genu *HER2* k počtu kopií Chr17 na buňku u případu invazivního karcinomu prsu nebo GEA. Stav genu *HER2* je klasifikován s použitím následujících pravidel:
 - a. Poměr $HER2/Chr17 \geq 2.0$ znamená amplifikováno
 - b. Poměr $HER2/Chr17 < 2.0$ znamená není amplifikováno
2. Adekvátnost sklička. Skličko s VENTANA *HER2* Dual ISH DNA Probe Cocktail musí splňovat tři kritéria, aby bylo považováno za adekvátní pro vyhodnocení. Pokud skličko tato kritéria nesplňuje, nelze je vyčíslit a výsledek je neuspokojivý.
 - a. Vnitřní pozitivní kontrola. Normální signály *HER2* a Chr17 (1 až 2 kopie na buňku) fungují jako vnitřní pozitivní kontroly a musejí být ve vzorku viditelné. Toto jaderné zbarvení může být umístěno v různých nenádorových buňkách, včetně: stromálních fibroblastů, endoteliálních buněk, lymfocytů a nenádorových epitelálních buněk.
 - b. Neoplastické buňky. S použitím objektivů 20x, 40x a/nebo 60x musí invazivní aspekt nádoru vykazovat vyčíslitelné pole signálů SISH a Red ISH.
 - c. Pozadí. Jakékoli barvení pozadí, které je výsledkem detekčních systémů SISH nebo Red ISH bude třeba vyhodnotit a určit, zda se ruší s vyčíslením specifických signálů SISH nebo Red ISH. Pozadí SISH se typicky jeví jako „prach“ SISH, který lze od specifického signálu odlišit. Pozadí Red se může jevit jako červený opar nebo záněd jako nespecifické signály, které mají slabší intenzitu v porovnání se specifickým signálem.
3. Cílové oblasti pro vyčíslení signálu. Přijatelná cílová oblast v invazivním karcinomu vyazuje vyčíslitelné pole signálů SISH a Red ISH. Vyčíslení signálu by se nemělo provádět v oblastech, které obsahují slabý signál SISH nebo Red ISH, stlačena nebo překrývající se jádra anebo nekrozu. Pokud je cílová oblast považována za neadekvátní pro vyčíslení, je často možné najít jiné cílové oblasti na stejném skličku, které adekvátní jsou. To lze určit podle přítomnosti normálních buněk vykazujících patřičné barvení SISH a Red ISH v cílové oblasti nebo v jejím sousedství.

Další pozorování pro *HER2* a chromozomu 17

Ostatní pozorování mohou být zaznamenána jako poznámky ve zprávě patologa.

1. Heterogenita: V některých případech může tkáň obsahovat oblasti karcinomu, které jsou geneticky heterogenní pro počet kopií *HER2* (tzn. může existovat směs neamplifikovaných a amplifikovaných jader nebo směs jader obsahujících různé kopie *HER2*). To lze pozorovat u buněk karcinomu ve vlastní cílové oblasti nebo mezi dvěma cílovými oblastmi.
2. Aneusomie je jakýkoli stav, při němž má organismus další chromozomy nebo méně specifických chromozomů, než je obvyklé, tzn. řada konkrétního chromozomu (v tomto případě Chromosome 17) není diploidní. Při polysomii mohou existovat tři nebo více kopií chromozomu spíše než očekávané dvě kopie. Při monosomii mohou nádorové buňky vykazovat pouze jednu kopii chromozomu Chromosome 17. Byla hlášena zjevná „amplifikace“, shluky nebo polysomie chromozomu 17 (s *HER2* SISH shluky či bez nich).²⁷ V případech shluků *HER2* a chromozomu 17 je nutno dbát na to, aby nebyly zvažovány s poměrem ~ 1.0. Hodnotitel by se měl v těchto případech podívat na výsledky z imunohistochemie (IHC) pro analýzy nadměrné exprese proteinu *HER2*, protože většina má tendenci být 3+.
3. Monoalelická delece: Delece genu *HER2* z chromozomu 17 v nádorových buňkách má za následek poměr $HER2/Chr17 < 1.0$.

Vizualizace signálů

Signály SISH a Red ISH jsou vizualizovány jako:

1. Jednotlivá kopie. Diskretní černý bod (SISH) se počítá jako jedna kopie *HER2*. Diskretní jednotlivé tečky vizualizované ve vnitřních, kontrolních (nenádorových) jádrech reprezentují velikost jednotlivé kopie v buňkách invazivního karcinomu pro

signál SISH (černý). Pro signály Red ISH se každý diskretní signál počítá jako jedna kopie. Je třeba poznamenat, že signál Red ISH z Chr17 se může zdát větší než signály SISH a někdy může mít prodloužený tvar. Může vzniknout růžový opar a je třeba, aby nebyl omylem považován za signál. Signály Red, které mají velmi světlou barvu v porovnání se signálem v jádrech vnitřní pozitivní kontroly a celkový vzor barvení, by neměly být vyčísleny, protože mohou být nespecifické. Specifické červené signály mají diskretní okraje, jak je znázorněno v Tab. 4.

- Několik kopií. Diskretní jednotlivé signály SISH vizualizované v jádrech vnitřní pozitivní kontroly představují velikost jednotlivé kopie *HER2* v buňkách invazivního karcinomu. Velikost jednoho signálu SISH se používá jako reference ke stanovení relativního počtu referenčních kopií v rakovinných jádrech. Pro signály Red ISH se každý diskretní signál počítá jako jedna kopie.
- Shluky. Přítomnost více překrývajících se signálů v jádru nelze vyčíslit. Shluk je definován jako četné překrývající se signály SISH v jádrech, které nelze individuálně rozlišit. Shluky *HER2* může odečítající pouze odhadovat. Například velký shluk několika signálů SISH lze odhadnout jako 12 kopií, zatímco malé shluky lze odhadnout jako 6 kopií. Odhad se provádí s použitím jednotlivých kopií SISH přítomných v buňkách vnitřní pozitivní kontroly jako reference. Přítomnost shluků *HER2* se zaznamenává na hodnoticím listu.
- Překrývající se jádra, jádra s přítomnou pouze jednou barvou a vzorky s nespecifickým barvením by neměly být vyčísleny. Veškerá jádra s překrývajícími se signály Red ISH a SISH, které nelze rozlišit, je třeba vizualizovat při větších zvětšeních pro rozlišení dvou signálů, nebo by neměly být počítány. Jádra, v nichž se objeví bubliny, by se neměla počítat.

Výpočet signálů SISH a Red ISH ke stanovení stavu genu *HER2*

Prozkoumejte skličko obarvené H&E pro lokalizaci oblastí obsahujících invazivní karcinom prsu nebo gastroezofageální karcinom. Prozkoumejte skličko obarvené metodou *HER2* Dual ISH odpovídající H&E a identifikujte cílovou oblast invazivního karcinomu prsu nebo gastroezofageálního karcinomu. Před výpočtem signálů *HER2* a chromozomu 17 pro stanovení stavu genu *HER2* je zásadně důležité určit, zda je invazivní cílová oblast (lézní tkáň) adekvátně obarvena a uspokojuje kritéria popsána pro adekvátnost sklička (viz výše uvedený oddíl Definice, 2. Adekvátnost sklička).

Hodnoticí algoritmus vyvinutý pro test maximalizuje preciznost a účinnost při počítání. Je třeba vyčíslit dvacet jader, každé z nich obsahující červené (Red ISH) a černé (SISH) signály.

Kritéria výběru buněk

Počítejte pouze průměry jader, které jsou reprezentativní pro průměrnou populaci jader invazivního karcinomu v cílové oblasti. Nepočítejte signály v jádrech, které:

- Mají mnohem větší průměrnou velikost, než je průměrná velikost jader u karcinomu.
- Mají mnohem menší průměrnou velikost, než je průměrná velikost jader u karcinomu.

Počítejte pouze jádra, která jsou reprezentativní pro populaci jader invazivního karcinomu s největším průměrným počtem signálů (SISH i Red ISH).

V cílových oblastech, které jsou geneticky heterogenní pro počet kopií *HER2*, počítejte pouze jádra, která jsou reprezentativní pro populaci jader invazivního karcinomu s největším průměrným počtem signálů (SISH i Red ISH). Všimněte si heterogenity přítomné na hodnoticím listu.

Tab. 4. Vizualizace signálů.

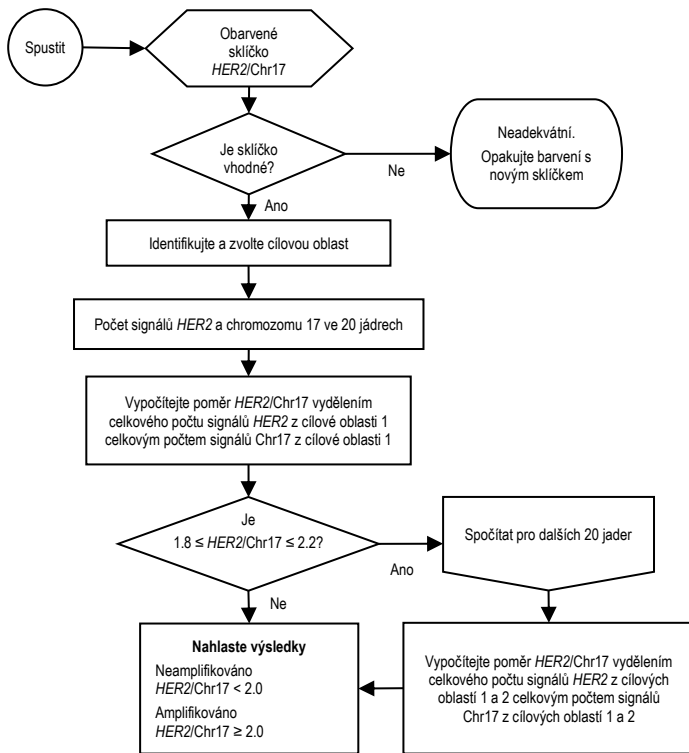
	Nepočítejte, pokud se jádra překrývají.
	Nepočítejte, pokud není přítomen žádný signál.
	Nepočítejte, pokud je přítomen signál pouze jedné barvy.

	Nepočítejte, pokud jsou signály mimo jádra.
	Počítejte jako 1 černý signál (<i>HER2</i>) a 1 červený signál (Chr17).
	Počítejte jako 2 černé signály (<i>HER2</i>) a 2 červené signály (Chr17).
	Počítejte jako 1 černý signál (<i>HER2</i>) a 2 červené signály (Chr17). Černý signál je „dublet“. Počítejte dva sousedící signály stejné barvy pouze tehdy, pokud je vzdálenost mezi signály větší nebo rovna průměru jednotlivého signálu.
	Malé shluky SISH lze odhadnout pouze s použitím velikosti jednotlivého signálu jako reference. Použijte stromální buňky k odhadu velikosti signálu (menší buňka). Například tento shluk je třeba odhadnout jako 6 signálů SISH – přidání dalších 2 jednotlivých signálů dává celkový počet 8. Počítejte 2 červené signály. Na hodnoticím listu zaznamenejte, že jsou přítomny shluky pro <i>HER2</i> .
	Odhadněte velikost shluku. Zde lze shluk rozpoznat jako 12 černých signálů – přidání dalších 4 jednotlivých signálů dává celkový počet 16. Počítejte červené signály jako 2 kopie Chr17. Na hodnoticím listu zaznamenejte, že jsou přítomny shluky pro <i>HER2</i> .
	Červený signál v blízkosti černého signálu je třeba počítat jako jeden červený signál a jeden černý signál. To může vyžadovat vyčíslení s objektivem 60x pro rozlišení. Proto počítejte jako 4 černé signály (<i>HER2</i>) a 2 červené signály (Chr17). Pokud nelze překrývající se signály rozlišit, toto jádro nepočítejte.
	Shluk černých teček zakrývající červený signál či červené signály. Lze použít větší zvětšení (60x) ve snaze potvrdit přítomnost nebo nepřítomnost červeného signálu či červených signálů, jinak je nepočítejte. Vždy používejte pouze jádra s jasnými červenými signály. Přítomnost shluků SISH zaznamenejte na hodnoticím listu. Jádra s viditelným a větším počtem červených signálů je třeba hodnotit v jádrech se shluky SISH.
	Pokud v jádru vzniká pozadí „prachu“ SISH, počítejte pouze specifické signály SISH, které lze jasně odlišit od pozadí.
	Může být pozorován růžový opar a je třeba, aby nebyl omylem považován za signál. Mohou být pozorovány slabé Red ISH signály a mohly by reprezentovat nespecifickou vazbu sondy Chr17 na jiné chromozomy. Na obrázku jsou 2 diskretní červené signály (Chr17) a 2 černé signály (<i>HER2</i>).

Stav genu *HER2*: Hodnoticí algoritmus pro VENTANA *HER2* Dual ISH DNA Probe Cocktail

Je třeba vyčíslit dvacet jader (každé z nich obsahující červené (Chr17) a černé (*HER2*) signály). Konečné výsledky pro stav *HER2* jsou hlášeny na základě poměru získaného vydělením součtu signálů *HER2* pro všech 20 jader součtem signálů chromozomu 17 pro

všech 20 jader. Stav amplifikace je definován jako „amplifikováno“, pokud je poměr $HER2/Chr17 \geq 2.0$, a jako „neamplifikováno“, pokud je poměr $HER2/Chr17 < 2.0$. Pokud poměr $HER2/Chr17$ spadá do rozmezí od 1.8 do 2.2, je třeba vyčíslit dalších 20 jader. Nový poměr se pak vypočítá na základě všech 40 jader a stav amplifikace je hlášen tak, jak již bylo popsáno.



Kontroly

Normální buňky v cílové oblasti nebo v její blízkosti slouží jako vnitřní kontroly barvení. Alespoň 50 % normálních buněčných jader by mělo obsahovat alespoň jeden signál SISH a alespoň 50 % by mělo obsahovat alespoň jeden signál Red ISH (signály SISH a Red ISH nemusejí být ve stejných buňkách), aby cílová oblast mohla být považována za adekvátní. Pokud není na některém ze sklíček s normálními buňkami v cyklu detekován adekvátní signál, znamená to, že takové sklíčko je neadekvátní pro vyčíslení. Použití vzorků pozitivní kontroly nebo sklíček Xenograf pomůže s řešením potenciálních problémů s přístrojem a/nebo reagenty.

OMEZENÍ

Obecná omezení

1. ISH je metodika zahrnující více kroků, která vyžaduje specializované vyškolení ve výběru vhodných reagentů, přípravě vzorků, zpracování, přípravě sklíčka ISH a interpretaci výsledků.
2. Barvení tkáně závisí na zacházení s tkání a na jejím zpracování před barvením. Nesprávná fixace, zmrazení, rozmrazení, promytí, sušení, zahřívání, řezání nebo kontaminace jinými tkáněmi či tekutinami mohou způsobit artefakty, zachycení reagentů, falešně negativní nebo falešně pozitivní výsledky. Nekonzistentní výsledky mohou být důsledkem odchylek metod fixace a zalévání nebo inherentních nepravidelností v tkáni.
3. Nadměrné nebo neúplné kontrastní barvení může narušit správnou interpretaci výsledků.
4. Klinická interpretace zabarvení musí být vyhodnocena v kontextu klinické anamnézy, morfolgie a dalších histopatologických kritérií. Je odpovědností kvalifikovaného patologa seznámit se s reagenty a metodami používanými k výrobě obarveného přípravku. Barvení musí být prováděno v certifikované

a licencované laboratoři pod dohledem patologa, který je odpovědný za kontrolu obarvených sklíček a zajištění adekvátnosti kontrol.

5. Společnost VENTANA poskytuje reagenty v optimálním ředění pro použití, pokud jsou dodrženy uvedené pokyny. Jakákoli odchylka od doporučených postupů testu může očekávané výsledky zneplatnit. Uživatelé, kteří se odchylují od doporučených postupů testu, musejí přijmout odpovědnost za interpretaci výsledků u pacientů.
6. Vzhledem k různým způsobům zpracování vzorku může být nezbytné prodloužit nebo zkrátit dobu ošetření ISH proteázou. Navíc zvýšení nebo snížení času úpravy buněk ovlivní výsledky barvení. Takové změny musí uživatel validovat. Uživatelé, kteří se odchylují od doporučených postupů testu, jsou odpovědní za interpretaci výsledků u pacientů za těchto okolností.
7. Reagenty mohou v dříve netestovaných tkáních vykazovat neočekávané reakce. Možnost neočekávaných reakcí nelze zcela vyloučit ani u testovaných skupin tkání, a to z důvodu biologické variability tkání. Se zdokumentovanými neočekávanými reakcemi se obraťte na místní servisní zastoupení.

SPECIFICKÁ OMEZENÍ

1. Ne všechna fixativa jsou kompatibilní s testem. Doporučeným fixativem je 10 % NBF po dobu 6 až 72 hodin.
2. Test VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail byl vyvinut k barvení řezů tkáně o tloušťce ~ 4 µm.²⁰ U řezů s tloušťkou větší než 4 µm může dojít ke ztrátě tkáně.
3. Všechny testy nemusejí být registrovány na každém přístroji. Pro více informací kontaktujte místní servisní zastoupení.
4. Oxidace, vyblednutí a/nebo zmizení signálu SISH mohou být způsobeny některými značkami fixačních médií. Kompatibilní fixační média jsou uvedena v Tab. 30.
5. Aby nedošlo k vytracení signálu Red ISH, nesmí se obarvená sklíčka kvůli dehydrataci ponořovat do alkoholových či acetonových lázní. Doporučuje se sušení na vzduchu nebo v sušárně. Obarvená sklíčka musejí být před aplikací do dodávacích krycích sklíček zcela suchá.
6. Stejně jako u jiných testů, negativní výsledek znamená, že nebyl detekován specifický cíl, nikoli že specifický cíl nebyl v testovaných buňkách nebo tkáních přítomen.
7. Tato sonda je optimalizována pro použití s reagenty VENTANA na přístrojích BenchMark IHC/ISH. Uživatelé, kteří se odchylují od doporučených postupů testu, jsou odpovědní za interpretaci výsledků u pacientů za těchto okolností.

FUNKČNÍ CHARAKTERISTIKY

Fungování testu VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail bylo vyhodnocováno v analytických a klinických studiích. Veškeré barvení bylo prováděno pomocí protokolu VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail, jak je uvedeno v Tab. 3, na přístrojích BenchMark IHC/ISH, pokud nebylo specifikováno jinak.

Tab. 5 a Tab. 6 shrnují údaje o fungování získané v těchto studiích: Studie shody, opakovatelnost a preciznost, preciznost v rámci hodnotitele a mezi hodnotiteli, preciznost mezi šaržemi, preciznost mezi laboratořemi pro přístroj, analytická senzitivita a specifita, charakterizace testu a stabilita. Podmnožina těchto studií je podrobněji popsána v následujících oddílech.

Tab. 5. Souhm výsledků fungování pro prs napříč analytickými a klinickými studiemi.

Vyhovuje	Nevyhovuje	Celkem	Poruchové režimy			
			Slabý/žádný HER2/Chr17 (vnitřní kontrola nebo cílové buňky)	Selhání pozadí	Žádná tkáň	Jiné
2893	127	3020	113 (3.74 %)	5 (0.17 %)	6 (0.20 %)	3 (0.10 %)

Tab. 6. Souhrn výsledků fungování pro žaludek napříč analytickými a klinickými studiiemi.

Vyhovuje	Nevyhovuje	Celkem	Poruchové režimy			
			Slabý/žádný HER2/Chr17 (vnitřní kontrola nebo cílové buňky)	Selhání pozadí	Žádná tkáň	Jiné
1340	17	1357	17 (1.25 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	0 (0 %)

KLINICKÁ VÝKONNOST

Studie shody s testem PathVysion: VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail na přístroji BenchMark ULTRA ve srovnání se soupravou Abbott/Vysis PathVysion HER-2 DNA Probe Kit

K vyhodnocení shody testu VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail se srovnávaným prostředkem, soupravou Abbott/Vysis PathVysion HER-2 FISH Kit, byla při stanovení stavu genu *HER2* u invazivního karcinomu prsu provedena na několika pracovištích studie shody. Na testování testu VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail se podílely tři centrální laboratoře. Bylo poskytnuto šest set třicet šest případů lidského invazivního karcinomu prsu ze tří klinických náborových pracovišť pro potenciální zařazení do studie na základě exprese proteinu *HER2*, dříve zjištěné metodou IHC. Garant studie dodal 133 případů. Centrálním laboratořím provádějícím test VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail a test PathVysion HER-2 FISH byl zaslepen stav IHC a původní identifikátor případu, aby nedošlo ke zkreslení ve vyhodnocování vzorků. Jedna centrální laboratoř provedla IHC barvení na všech vzorcích pomocí protilátky PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5) Rabbit Monoclonal Primary Antibody (protilátka PATHWAY anti-HER2 (4B5)) pro další analýzy. Výsledky testu barvení FISH a VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail byly vyčísleny počítáním nejméně 20 jader pro každý vzorek. Výsledky byly hlášeny jako: Poměr *HER2*/Chr 17 ≥ 2.0 jako amplifikováno; *HER2*/Chr 17 < 2.0 jako neamplifikováno. Ze 678 případů, které byly barveny s použitím testů FISH i VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail, bylo 605 vzorků vyčíslitelných z obou testů, a proto byly zařazeny do analýzy míry shody.

Primární výsledky

Primární analýza porovnávala poměry pozitivní a negativní procentuální shody k posouzení shody mezi testy VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail a PathVysion HER-2 FISH u karcinomu prsu. Data pro amplifikovanou a neamplifikovanou klinická posouzení pro každý test, sdružující data ze všech pracovišť, jsou prezentována v tabulce 2 x 2 níže společně s mírami pozitivní a negativní procentuální shody, kde test PathVysion HER-2 FISH je referenčním testem. Kritéria přijatelnosti k demonstrování ekvivalentního fungování těchto dvou testovacích metod při použití přístroje BenchMark ULTRA vyžadovala oboustranný 95 % interval spolehlivosti hodnocení s dolní hranicí 85 % nebo vyšší u sdružených dat ze všech tří pracovišť. Tato kritéria přijatelnosti byla splněna (Tab. 7). Navíc byly poměry pozitivní a negativní shody na jednotlivých pracovištích všechny větší než 85 % (Tab. 8).

Tab. 7. Shoda mezi testem VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail a soupravou Abbott/Vysis PathVysion HER-2 DNA Probe Kit v kohortě vzorků lidského karcinomu prsu.

Výsledek testu VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail	Výsledek testu PathVysion HER-2 FISH		
	Amplifikováno	Neamplifikováno	Celkem
Amplifikováno	270	12	282
Neamplifikováno	32	291	323
Celkem	302	303	605
	n/N	% (95 % CI skóre)	
Pozitivní procentuální shoda	270/302	89.4 (85.4, 92.4)	
Negativní procentuální shoda	291/303	96.0 (93.2, 97.7)	

Tab. 8. Shrnutí negativní, pozitivní a celkové míry shody pro VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail a Abbott/Vysis PathVysion HER-2 DNA Probe Kit na vzorcích lidského karcinomu prsu, prezentované pro jednotlivá centra.

VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail versus PathVysion HER-2 FISH	Pozitivní procentuální shoda	Negativní procentuální shoda	Celková procentuální shoda
Pracoviště A: n/N (%) (95 % CI)	92/100 (92.0 %) (85.0, 95.9)	92/93 (98.9 %) (94.2, 99.8)	184/193 (95.3 %) (91.4, 97.5)
Pracoviště B: n/N (%) (95 % CI)	93/103 (90.3 %) (83.0, 94.6)	108/119 (90.8 %) (84.2, 94.8)	201/222 (90.5 %) (86.0, 93.7)
Pracoviště C: n/N (%) (95 % CI)	85/99 (85.9 %) (77.7, 91.4)	91/91 (100.0 %) (95.9, 100.0)	176/190 (92.6 %) (88.0, 95.6)

Tato data naznačují skvělou shodu mezi testem VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail a soupravou PathVysion HER-2 FISH Kit při stanovování stavu genu *HER2* ve vzorcích lidského karcinomu prsu.

Sekundární výsledky

Celková procentuální shoda mezi VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail a PathVysion HER-2 FISH Kit a její oboustranný 95 % CI hodnocení, sdružující data ze všech klinických pracovišť, byla 92.7 % (90.4, 94.5).

Sekundární výsledky: IHC vs. ISH pro stav HER2

Studie shody srovnávající metody VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail a PathVysion FISH byla navržena tak, aby hodnotila také případy na základě jejich IHC skóre pro hladiny proteinu *HER2* (IHC hodnocení je popsáno v metodickém listu protilátky PATHWAY anti-HER2 (4B5) [P/N 14427EN]). To umožnilo sekundární analýzu k porovnání míry shody mezi protilátkou PATHWAY anti-HER2 (4B5) a testem VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail a mezi protilátkou PATHWAY anti-HER2 (4B5) a testem PathVysion FISH. V této studii se IHC hodnocení 2+/3+ považovalo za pozitivní na nadměrnou expresi *HER2*. Údaje o shodě pro test PathVysion HER-2 FISH a protilátkou PATHWAY HER2/neu (4B5) jsou uvedeny v Tab. 9. Údaje o shodě pro test VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail a protilátkou PATHWAY HER2/neu (4B5) jsou uvedeny v Tab. 10.

Tab. 9. Srovnání IHC na přístroji BenchMark ULTRA oproti FISH: Sdružená data ze všech center.

		Výsledek testu PathVysion HER-2 FISH		
		Amplifikováno	Neamplifikováno	Celkem
Výsledky pro protilátku PATHWAY HER2 (4B5)	Pozitivní (případy 2+/3+)	277	63	340
	Negativní (0/1+)	27	238	265
	Celkem	304	301	605
		n/N	% (95 % CI skóre)	
Pozitivní procentuální shoda		277/304	91.1 (87.4, 93.8)	

Tab. 10. Srovnání IHC na přístroji BenchMark ULTRA oproti testu VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail: Sdružená data ze všech center.

		Výsledek testu VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail		
		Amplifikováno	Neamplifikováno	Celkem
Výsledky pro protilátku PATHWAY HER2 (4B5)	Pozitivní (případy 2+/3+)	248	78	326
	Negativní (0/1+)	18	253	271
	Celkem	266	331	597
		n/N	% (95 % CI skóre)	
Pozitivní procentuální shoda		248/266	93.2 (89.6, 95.7)	

Studie shody: Test VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail na přístroji BenchMark ULTRA oproti testu Dako HER2 IQFISH pharmDx™ Kit

Byla provedena studie shody k vyhodnocení testu VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail ve srovnání se soupravou Dako HER2 IQFISH pharmDx™ Kit pro fluorescenční hybridizaci in situ (FISH) při stanovení stavu genu *HER2* u GEA. Srovnatelnost testu pro vzorky GEA byla stanovována porovnáváním výsledků barvení ze dvou testů (Tab. 11). Sto třicet čtyři (134) vzorků lidského GEA (mix amplifikovaných a neamplifikovaných případů) bylo obarveno s použitím testu VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail. Stejná kohorta byla obarvena s použitím testu Dako HER2 IQFISH pharmDx™. Výsledky podrobně rozvádějící míru negativní, pozitivní a celkové shody pro 146 vzorků z této kohorty, které byly vyčísleny testem Dako HER2 IQFISH pharmDx™ i testem VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail, jsou uvedeny v Tab. 11 a Tab. 12.

Tab. 11. Shoda mezi testy VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail a Dako HER2 IQFISH pharmDx™ v kohortě vzorků lidského GEA.

Stav amplifikace u testu VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail	Stav amplifikace u testu Dako HER2 IQFISH pharmDx™	
	Amp.	Neamp.
Amp.	49	8
Neamp.	5	84

Tab. 12. Shrnutí negativní, pozitivní a celkové míry shody pro testy VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail a Dako HER2 IQFISH pharmDx™ na vzorcích lidského GEA.

	Negativní Míra shody		Pozitivní Míra shody		Celková Míra shody	
	Nezpracovaná data / počet případů	Procentuální (95 % CI skóre)	Nezpracovaná data / počet případů	Procentuální (95 % CI skóre)	Nezpracovaná data / počet případů	Procentuální (95 % CI skóre)
VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail	84/92	91.3 (83.8–95.5)	49/54	90.7 (80.1–96.0)	133/146	91.1 (85.4–94.7)

ANALYTICKÁ VÝKONNOST

Opakovatelnost a preciznost u karcinomu prsu pro přístroj BenchMark IHC/ISH

Opakovatelnost a preciznost testu VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail byla vyhodnocována na přístrojích BenchMark IHC/ISH v kombinaci s detekční soupravou VENTANA Silver ISH DNP Detection Kit a VENTANA Red ISH DIG Detection Kit.

Opakovatelnost v rámci cyklu byla vyhodnocována s použitím 28 vzorků karcinomu prsu. Dva replikáty sklíčka pro každý ze vzorků byly barveny s použitím testu VENTANA HER2

Dual ISH DNA Probe Cocktail na jednom přístroji BenchMark ULTRA, BenchMark XT nebo BenchMark GX. Pro analýzu dat z přístrojů BenchMark XT a GX byly váženy případy s poměry mezi 1.5 a 2.5 z hlediska jejich prevalence.

Mezilehlá preciznost mezi dny byla také vyhodnocována s použitím vzorků karcinomu prsu. Replikáty sklíček pro každý z 28 vzorků byly barveny s použitím testu VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail na přístrojích BenchMark IHC/ISH v 5 po sobě nenásledujících dnech. Pro analýzu dat z přístrojů BenchMark XT a BenchMark GX byly váženy případy s poměry mezi 1.5 a 2.5 z hlediska jejich prevalence.

Opakovatelnost v rámci cyklu byla stanovena jako průměrná pozitivní shoda (APA), průměrná negativní shoda (ANA) a celková procentuální shoda (OPA). Mezilehlá preciznost mezi dny byla stanovena pro pozitivní procentuální shodu (PPA), negativní procentuální shodu (NPA) a celkovou procentuální shodu (OPA) pro všechna pozorování vyhodnotitelné populace. Souhrn výsledků pro obě studie lze najít v Tab. 13.

Tab. 13. Opakovatelnost v rámci cyklu a mezilehlá preciznost mezi dny u přístroje BenchMark IHC/ISH.

Platforma	Opakovatelnost/preciznost	Klinický stav	shoda			
			Typ	n/N	%	95 % CI
ULTRA	Opakovatelnost v rámci cyklu	Amplifikováno	APA	194/194	100	(98.1, 100)
		Neamplifikováno	ANA	186/186	100	(98.0, 100)
		Celkem	OPA	190/190	100	(98.0, 100)
ULTRA	Mezilehlá preciznost mezi dny	Amplifikováno	PPA	139/139	100	(97.3, 100)
		Neamplifikováno	NPA	135/135	100	(97.2, 100)
		Celkem	OPA	274/274	100	(98.6, 100)
XT	Opakovatelnost v rámci cyklu	Amplifikováno	APA	128.8/128.8	100	(97.1, 100)
		Neamplifikováno	ANA	151.2/151.2	100	(97.5, 100)
		Celkem	OPA	140.0/140.0	100	(97.3, 100)
XT	Mezilehlá preciznost mezi dny	Amplifikováno	PPA	128.8/128.8	100	(97.1, 100)
		Neamplifikováno	NPA	151.2/151.2	100	(97.5, 100)
		Celkem	OPA	280.0/280.0	100	(98.6, 100)
GX	Opakovatelnost v rámci cyklu	Amplifikováno	APA	128.8/128.8	100	(97.1, 100)
		Neamplifikováno	ANA	151.2/151.2	100	(97.5, 100)
		Celkem	OPA	140.0/140.0	100	(97.3, 100)
GX	Mezilehlá preciznost mezi dny	Amplifikováno	PPA	128.8/128.8	100	(97.1, 100)
		Neamplifikováno	NPA	151.2/151.2	100	(97.5, 100)
		Celkem	OPA	280.0/280.0	100	(98.6, 100)

Poznámka: 95 % CI byly vypočítány s použitím metody percentilový bootstrap; v případech, kdy byl odhad bodu 100 %, byla použita metoda Wilsonova skóre. Do studie byly zahrnuty čtyři případy s poměry ISH mezi 1.5 a 2.5 včetně.

Mezilehlá preciznost mezi přístroji u karcinomu prsu

Mezilehlá preciznost mezi přístroji BenchMark IHC/ISH pro test VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail byla stanovena barvením replikátů sklíček 28 vzorků karcinomu prsu na 3 přístrojích BenchMark IHC/ISH s koktejlem VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail s použitím detekční soupravy VENTANA Silver ISH DNP Detection Kit a VENTANA Red ISH DIG Detection Kit. Mezilehlá preciznost mezi přístroji byla stanovena s PPA, NPA a OPA pro všechna pozorování vyhodnotitelné populace. Případy s poměry mezi 1.5 a 2.5 byly váženy podle jejich prevalence (přístroje BenchMark XT / BenchMark GX). Souhrn výsledků z této studie lze najít v Tab. 14.

Tab. 14. Mezilehlá preciznost mezi přístroji BenchMark IHC/ISH.

Platforma	Preciznost	Klinický stav	shoda			
			Typ	n/N	%	95 % CI
ULTRA	Mezilehlá preciznost mezi přístroji	Amplifikováno	PPA	84/84	100	(95.6, 100)
		Neamplifikováno	NPA	84/84	100	(95.6, 100)
		Celkem	OPA	168/168	100	(97.8, 100)
XT	Mezilehlá preciznost mezi přístroji	Amplifikováno	PPA	77.3/77.3	100	(95.3, 100)
		Neamplifikováno	NPA	90.7/90.7	100	(95.9, 100)
		Celkem	OPA	168.0/168.0	100	(97.8, 100)
GX	Mezilehlá preciznost mezi přístroji	Amplifikováno	PPA	76.2/76.2	100	(95.2, 100)
		Neamplifikováno	NPA	90.7/90.7	100	(95.9, 100)
		Celkem	OPA	166.9/166.9	100	(97.8, 100)

Poznámka: 95 % intervaly spolehlivosti (CI) byly vypočítány s použitím metody percentilový bootstrap; v případech, kdy byl odhad bodu 100 %, byla použita metoda Wilsonova skóre. Do studie byly zahrnuty čtyři případy s poměry ISH mezi 1.5 a 2.5 včetně.

Preciznost v rámci hodnotitele a mezi hodnotiteli u karcinomu prsu

Preciznost u jednoho hodnotitele a mezi hodnotiteli u přístroje BenchMark IHC/ISH pro test VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail byla stanovena tak, že tři hodnotitelé vyhodnocovali 60 vzorků karcinomu prsu obarvených pomocí testu VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail s použitím detekční soupravy VENTANA Silver ISH DNP Detection Kit a VENTANA Red ISH DIG Detection Kit na přístroji BenchMark ULTRA. Pro vyhodnocení preciznosti u jednoho hodnotitele byla stejná sada sklíček odečítána dvakrát, přičemž mezi odečty uplynuly minimálně dva týdny. Preciznost u jednoho hodnotitele a mezi hodnotiteli byla stanovena s APA, ANA a OPA pro všechna pozorování z vyhodnotitelné populace. Souhrn výsledků z této studie lze najít v Tab. 15.

Tab. 15. Přístroj BenchMark ULTRA – preciznost u jednoho hodnotitele a mezi hodnotiteli.

Preciznost	Klinický stav	shoda			
		Typ	n/N	%	95 % CI
U jednoho hodnotitele	Amplifikováno	APA	178/181	98.3	(96.3, 100)
	Neamplifikováno	ANA	174/177	98.3	(96.1, 100)
	Celkem	OPA	176/179	98.3	(96.1, 100)

Preciznost	Klinický stav	shoda			
		Typ	n/N	%	95 % CI
Mezi hodnotiteli	Amplifikováno	APA	350/362	96.7	(93.2, 99.4)
	Neamplifikováno	ANA	342/354	96.6	(92.8, 99.4)
	Celkem	OPA	346/358	96.6	(92.8, 99.4)

Poznámka: 95 % intervaly spolehlivosti (CI) byly vypočteny pomocí metody percentilový bootstrap. Do studie bylo zahrnuto šest případů s poměry ISH mezi 1.5 a 2.5 včetně.

Mezilehlá preciznost mezi platformami u karcinomu prsu

Preciznost mezi platformami na přístrojích BenchMark IHC/ISH pro test VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail byla stanovena hodnocením 28 vzorků karcinomu prsu barvených pomocí VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail s použitím detekční soupravy VENTANA Silver ISH DNP Detection Kit a VENTANA Red ISH DIG Detection Kit na přístrojích BenchMark IHC/ISH. Preciznost mezi platformami byla stanovena u PPA, NPA a OPA pro všechna pozorování vyhodnotitelné populace. Případy s poměry mezi 1.5 a 2.5 byly váženy podle jejich prevalence. Souhrn výsledků z této studie lze najít v Tab. 16.

Tab. 16. Přístroj BenchMark IHC/ISH – preciznost mezi platformami.

Preciznost	Klinický stav	shoda			
		Typ	n/N	%	95 % CI
Preciznost mezi platformami	Amplifikováno	PPA	230.8/230.8	100	(98.4, 100)
	Neamplifikováno	NPA	271.0/272.2	99.6	(98.3, 100)
	Celkem	OPA	501.8/502.9	99.8	(99.2, 100)

Poznámka: 95 % intervaly spolehlivosti (CI) byly vypočítány s použitím metody percentilový bootstrap; v případech, kdy byl odhad bodu 100 %, byla použita metoda Wilsonova skóre. Do studie byly zahrnuty čtyři případy s poměry ISH mezi 1.5 a 2.5 včetně.

Přístroj BenchMark IHC/ISH: opakovatelnost a preciznost u adenokarcinomu žaludku

Opakovatelnost a preciznost testu VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail byla vyhodnocoována na přístrojích BenchMark IHC/ISH v kombinaci s detekční soupravou VENTANA Silver ISH DNP Detection Kit a VENTANA Red ISH DIG Detection Kit.

Opakovatelnost v rámci cyklu byla vyhodnocena s použitím čtrnácti vzorků adenokarcinomu žaludku. Dva replikáty sklíčka pro každý ze vzorků adenokarcinomu žaludku byla barvena s použitím VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail na jednom přístroji BenchMark IHC/ISH. Případy s poměry mezi 1.5 a 2.5 byly váženy podle jejich prevalence.

Mezilehlá preciznost mezi dny byla také vyhodnocoována s použitím vzorků adenokarcinomu žaludku. Replikáty sklíčka pro každý ze čtrnácti vzorků byly barveny s použitím testu VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail na přístrojích BenchMark IHC/ISH v 5 po sobě nenásledujících dnech. Případy s poměry mezi 1.5 a 2.5 byly váženy podle jejich prevalence.

Opakovatelnost v rámci cyklu byla stanovena jako průměrná pozitivní shoda (APA), průměrná negativní shoda (ANA) a celková procentuální shoda (OPA). Mezilehlá preciznost mezi dny byla stanovena pro pozitivní procentuální shodu (PPA), negativní procentuální shodu (NPA) a celkovou procentuální shodu (OPA) pro všechna pozorování vyhodnotitelné populace. Souhrn výsledků pro obě studie lze najít v Tab. 17.

Tab. 17. Přístroj BenchMark IHC/ISH: opakovatelnost v rámci cyklu a mezilehlá preciznost mezi dny.

Platforma	Opakovatelnost/preciznost	Klinický Stav	shoda			
			Typ	n/N	%	95 % CI
ULTRA	Opakovatelnost v rámci cyklu	Amplifikováno	APA	70.0/70.0	100	(94.8, 100)
		Neamplifikováno	ANA	70.0/70.0	100	(94.8, 100)
		Celkem	OPA	70.0/70.0	100	(94.8, 100)
ULTRA	Mezilehlá preciznost mezi dny	Amplifikováno	PPA	70.0/70.0	100	(94.8, 100)
		Neamplifikováno	NPA	70.0/70.0	100	(94.8, 100)
		Celkem	OPA	140.0/140.0	100	(97.3, 100)
XT	Opakovatelnost v rámci cyklu	Amplifikováno	APA	70.0/70.0	100	(94.8, 100)
		Neamplifikováno	ANA	70.0/70.0	100	(94.8, 100)
		Celkem	OPA	70.0/70.0	100	(94.8, 100)
XT	Mezilehlá preciznost mezi dny	Amplifikováno	PPA	70.0/70.0	100	(94.8, 100)
		Neamplifikováno	NPA	70.0/70.0	100	(94.8, 100)
		Celkem	OPA	140.0/140.0	100	(97.3, 100)
GX	Opakovatelnost v rámci cyklu	Amplifikováno	APA	64.6/65.1	99.1	(95.9, 100)
		Neamplifikováno	ANA	70.0/70.6	99.2	(95.2, 100)
		Celkem	OPA	67.3/67.9	99.2	(96.9, 100)
GX	Mezilehlá preciznost mezi dny	Amplifikováno	PPA	67.3/67.9	99.2	(96.5, 100)
		Neamplifikováno	NPA	70.0/70.0	100	(94.8, 100)
		Celkem	OPA	137.3/137.9	99.6	(98.5, 100)

Poznámka: 95% intervaly spolehlivosti (CI) byly vypočítány s použitím metody percentilový bootstrap; v případech, kdy byl odhad bodu 100 %, byla použita metoda Wilsonova skóre. Do studie byly zahrnuty dva případy s poměry ISH mezi 1.5 a 2.5 včetně.

Mezilehlá preciznost mezi přístroji u adenokarcinomu žaludku

Mezilehlá preciznost mezi přístroji BenchMark IHC/ISH pro test VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail byla stanovena barvením replikátů sklíček čtrnácti vzorků adenokarcinomu žaludku na 3 přístrojích BenchMark IHC/ISH s VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail s použitím detekční soupravy VENTANA Silver ISH DNP Detection Kit a VENTANA Red ISH DIG Detection Kit. Mezilehlá preciznost mezi přístroji byla stanovena s PPA, NPA a OPA pro všechna pozorování vyhodnotitelné populace. Případy s poměry mezi 1.5 a 2.5 byly váženy podle jejich prevalence. Souhm výsledků z této studie lze najít v Tab. 18.

Tab. 18. Mezilehlá preciznost mezi přístroji BenchMark IHC/ISH.

Platforma	Preciznost	Klinický stav	shoda			
			Typ	n/N	%	95 % CI
ULTRA	Mezilehlá preciznost mezi přístroji	Amplifikováno	PPA	42.0/42.0	100	(91.6, 100)
		Neamplifikováno	NPA	42.0/42.0	100	(91.6, 100)
		Celkem	OPA	84.0/84.0	100	(95.6, 100)
XT	Mezilehlá preciznost mezi přístroji	Amplifikováno	PPA	40.4/40.9	98.6	(94.1, 100)
		Neamplifikováno	NPA	40.9/40.9	100	(91.4, 100)
		Celkem	OPA	81.3/81.9	99.3	(97.5, 100)
GX	Mezilehlá preciznost mezi přístroji	Amplifikováno	PPA	40.9/40.9	100	(91.4, 100)
		Neamplifikováno	NPA	42.0/42.0	100	(91.6, 100)
		Celkem	OPA	82.9/82.9	100	(95.6, 100)

Poznámka: 95% intervaly spolehlivosti (CI) byly vypočítány s použitím metody percentilový bootstrap; v případech, kdy byl odhad bodu 100 %, byla použita metoda Wilsonova skóre. Do studie byly zahrnuty dva případy s poměry ISH mezi 1.5 a 2.5 včetně.

Preciznost u jednoho hodnotitele a mezi hodnotiteli u adenokarcinomu žaludku

Preciznost u jednoho hodnotitele a mezi hodnotiteli u přístroje BenchMark IHC/ISH pro test VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail byla stanovována tak, že tři hodnotitelé vyhodnocovali 28 vzorků adenokarcinomu žaludku obarvených VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail s použitím detekční soupravy VENTANA Silver ISH DNP Detection Kit a VENTANA Red ISH DIG Detection Kit na přístroji BenchMark ULTRA. Všechna sklíčka byla randomizována a zamaskována na diagnózu případu. Pro vyhodnocení preciznosti u jednoho hodnotitele byla stejná sada sklíček odečítána dvakrát, přičemž mezi odečty uplynuly minimálně dva týdny. Preciznost u jednoho hodnotitele a mezi hodnotiteli byla stanovena u APA, ANA a OPA pro všechna pozorování z vyhodnotitelné populace. Souhm výsledků z této studie lze najít v Tab. 19.

Tab. 19. Přístroj BenchMark ULTRA – preciznost u jednoho hodnotitele a mezi hodnotiteli.

Preciznost	Klinický stav	shoda			
		Typ	n/N	%	95 % CI
Mezi hodnotiteli	Amplifikováno	APA	80/84	95.2	(90.5, 100)
	Neamplifikováno	ANA	80/84	95.2	(90.5, 100)
	Celkem	OPA	80/84	95.2	(90.5, 100)
U jednoho hodnotitele	Amplifikováno	APA	82/84	97.6	(95.2, 100)
	Neamplifikováno	ANA	82/84	97.6	(95.2, 100)
	Celkem	OPA	82/84	97.6	(95.2, 100)

Poznámka: 95 % intervaly spolehlivosti (CI) byly vypočteny pomocí metody percentilový bootstrap. Do studie byly zahrnuty dva případy s poměry ISH mezi 1.5 a 2.5 včetně.

Preciznost mezi platformami u adenokarcinomu žaludku

Preciznost mezi platformami na přístrojích BenchMark IHC/ISH pro test VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail byla stanovena hodnocením čtrnácti vzorků adenokarcinomu žaludku barvených pomocí VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail s použitím detekční soupravy VENTANA Silver ISH DNP Detection Kit a VENTANA Red ISH DIG Detection Kit na přístrojích BenchMark IHC/ISH. Preciznost mezi platformami byla stanovena u PPA, NPA a OPA pro všechna pozorování vyhodnotitelné populace. Případy s poměry mezi 1.5 a 2.5 byly váženy podle jejich prevalence. Souhrn výsledků z této studie lze najít v Tab. 20.

Tab. 20. Přístroj BenchMark IHC/ISH: preciznost mezi platformami.

Preciznost	Klinický stav	shoda			
		Typ	n/N	%	95 % CI
Preciznost mezi platformami	Amplifikováno	PPA	123.3/123.9	99.5	(98.1, 100)
	Neamplifikováno	NPA	124.9/124.9	100	(97.0, 100)
	Celkem	OPA	248.2/248.8	99.8	(99.2, 100)

Poznámka: 95 % intervaly spolehlivosti (CI) byly vypočítány s použitím metody percentilový bootstrap; v případech, kdy byl odhad bodu 100 %, byla použita metoda Wilsonova skóre. Do studie byly zahrnuty dva případy s poměry ISH mezi 1.5 a 2.5 včetně.

Preciznost mezi šaržemi u karcinomu prsu

Preciznost od šarže k šarži byla stanovována testováním 3 výrobních šarží VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail, VENTANA Silver ISH DNP Detection Kit a VENTANA Red ISH DIG Detection Kit na přístrojích BenchMark ULTRA. Dvacet osm případů karcinomu prsu bylo barveno s každou sondou a detekční soupravou. Souhrn výsledků pro preciznost mezi šaržemi pro test je uveden v Tab. 21.

Tab. 21. Preciznost mezi šaržemi.

Preciznost	Klinický stav	shoda			
		Typ	n/N	%	95 % CI
Mezi šaržemi	Amplifikováno	PPA	121/121	100	(96.9, 100)
	Neamplifikováno	NPA	123/123	100	(97.0, 100)
	Celkem	OPA	244/244	100	(98.5, 100)

Poznámka: 95 % intervaly spolehlivosti (CI) byly vypočítány s použitím metody percentilový bootstrap; v případech, kdy byl odhad bodu 100 %, byla použita metoda Wilsonova skóre. Do studie byly zahrnuty čtyři případy s poměry ISH mezi 1.5 a 2.5 včetně.

Studie reprodukovatelnosti testu mezi laboratořemi na přístroji BenchMark ULTRA u karcinomu prsu a adenokarcinomu žaludku

Byla provedena studie reprodukovatelnosti mezi laboratořemi (ILR) pro vyhodnocení reprodukovatelnosti testu VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail pro stanovení stavu genu *HER2* ve tkáni karcinomu prsu a adenokarcinomu žaludku, barvené na přístroji BenchMark ULTRA, v kombinaci s detekčními soupravami VENTANA Silver ISH DNP Detection Kit a VENTANA Red ISH DIG Detection Kit.

Bylo použito dvacet osm vzorků tkáně karcinomu prsu a adenokarcinomu žaludku FFPE a přibližně polovina těchto případů byla amplifikována pro stav exprese *HER2* a polovina nebyla amplifikována pro stav *HER2*.

Z každého vzorku bylo pořízeno několik řezů tkáně a poskytnuto 3 externím pracovištím provádějícím studii. Každé centrum obarvilo 28 případů tkáně prsu a 28 případů tkáně žaludku, vždy v 5 po sobě nenásledujících dnech, v průběhu minimálně 20 dnů. Po barvení na přístroji BenchMark ULTRA vyhodnocoval hodnotitel každé skličko pro přiřazení stavu genu *HER2*.

Výsledky studie jsou shrnuty v Tab. 22 a Tab. 23. Data byla analyzována na PPA a NPA u všech pozorování. Pro každý případ byla všechna vyhodnotitelná pozorování (amplifikováno oproti neamplifikováno) porovnávána proti modálnímu výsledku pro každý případ. Případy s poměry mezi 1.5 a 2.5 byly váženy podle jejich prevalence. Tato srovnání byla sdružena pro všechna pracoviště a všechny dny a pak byly výsledky shromážděny pro všechny případy.

Tab. 22. ILR: Míry shody na přístroji BenchMark ULTRA pro karcinom prsu.

Reprodukovatelnost mezi laboratořemi	Shoda				
	Typ	n/N	%	95 % CI	
Mezi pracovišti (3 pracoviště)	PPA	208.9/208.9	100	(98.2, 100.0)	
	NPA	198.1/200.3	98.9	(96.8, 100.0)	
	OPA	407.0/409.3	99.5	(98.4, 100.0)	
Mezi dny (5 na sebe nenavazujících dnů)	Pracoviště A	PPA	72/74	97.3	(92.3, 100.0)
		NPA	63/63	100	(94.3, 100.0)
		OPA	135/137	98.5	(95.6, 100.0)
	Pracoviště B	PPA	70/70	100	(94.8, 100.0)
		NPA	63/64	98.4	(95.8, 100.0)
		OPA	133/134	99.3	(97.8, 100.0)
	Pracoviště C	PPA	70/70	100	(94.8, 100.0)
		NPA	69/69	100	(94.7, 100.0)
		OPA	139/139	100	(97.3, 100.0)

Poznámka: 95 % intervaly spolehlivosti (CI) byly vypočítány s použitím metody percentilový bootstrap; v případech, kdy byl odhad bodu 100 %, byla použita metoda Wilsonova skóre. Do studie byly zahrnuty čtyři případy s poměry ISH mezi 1.5 a 2.5 včetně.

Tab. 23. ILR: Míry shody na přístroji BenchMark ULTRA pro adenokarcinom žaludku.

Reprodukovatelnost mezi laboratořemi	Shoda				
	Typ	n/N	%	95 % CI	
Mezi pracovišti (3 pracoviště)	PPA	206.8/206.8	100	(98.2, 100.0)	
	NPA	208.4/208.9	99.7	(99.2, 100.0)	
	OPA	415.1/415.7	99.9	(99.6, 100.0)	
Mezi dny (5 na sebe nenavazujících dnů)	Pracoviště A	PPA	70/70	100	(94.8, 100.0)
		NPA	69/70	98.6	(96.0, 100.0)
		OPA	139/140	99.3	(97.9, 100.0)
	Pracoviště B	PPA	67/67	100	(94.6, 100.0)
		NPA	69/69	100	(94.7, 100.0)
		OPA	136/136	100	(97.3, 100.0)
	Pracoviště C	PPA	70/70	100	(94.8, 100.0)
		NPA	70/70	100	(94.8, 100.0)
		OPA	140/140	100	(97.3, 100.0)

Poznámka: 95 % intervaly spolehlivosti (CI) byly vypočítány s použitím metody percentilový bootstrap; v případech, kdy byl odhad bodu 100 %, byla použita metoda Wilsonova skóre. Do studie byly zahrnuty čtyři případy s poměry ISH mezi 1.5 a 2.5 včetně.

Fungování testu VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail na přístroji BenchMark ULTRA PLUS

Shoda mezi přístroji BenchMark ULTRA PLUS a BenchMark ULTRA pro karcinom prsu

Tři laboratoře z různých institucí ve Spojených státech amerických se zúčastnily studie shody mezi přístrojem BenchMark ULTRA PLUS a přístrojem BenchMark ULTRA. K dispozici bylo 193 unikátních případů invazivního karcinomu prsu FFPE, které reprezentovaly rozsah barvení testu VENTANA HER2 Dual ISH Cocktail, s přibližně stejným rozdělením mezi případy s amplifikací *HER2* a bez amplifikace *HER2*. Sklíčka s tkáněmi ze všech případů byla obarvena pomocí H&E a koktejlu VENTANA HER2 Dual ISH Cocktail od společnosti Roche na přístroji BenchMark ULTRA za použití doporučeného barvicího protokolu. Neobarvená sklíčka s tkáněmi ze všech případů byla náhodně a rovnoměrně rozdělena (64–65 případů na jedno pracoviště) napříč pracovišti provádějícími studii pro barvení na přístroji BenchMark ULTRA PLUS s použitím doporučeného barvicího protokolu pro test VENTANA HER2 Dual ISH Cocktail. Patologové, kteří neznali stav případu, vyhodnotili sklíčka obarvená na jednom přístroji BenchMark IHC/ISH a stanovili stav genu *HER2*. Po dvoutýdenním období patologové vyhodnotili sklíčka obarvená na druhém přístroji BenchMark IHC/ISH. Stav genu *HER2* byl stanoven pomocí poměru signálů genu *HER2* k signálům chromozomu 17 (Chr17) (tj. poměru *HER2* : Chr17) v jádrech nádorových buněk. Pokud byl tento poměr 2.0 nebo vyšší, byl případ považován za případ s amplifikací *HER2*; pokud byl nižší než 2.0, byl považován za případ bez amplifikace *HER2*. Výsledky byly analyzovány společností Roche. Míry OPA, PPA a NPA byly 97.1 % (535/551), 97.3 % (248/255), respektive 97.0 % (287/296). Výsledky jsou shrnuty v Tab. 24.

Tab. 24. Souhrnná shoda stavu genu *HER2* u případů karcinomu prsu obarvených koktejlem VENTANA HER2 Dual ISH Cocktail na přístroji BenchMark ULTRA PLUS vs. BenchMark ULTRA

Stav genu <i>HER2</i> stanovený na přístroji BenchMark ULTRA PLUS	Stav genu <i>HER2</i> stanovený na přístroji BenchMark ULTRA		Celkem
	Amplifikováno	Neamplifikováno	
Amplifikováno	248	9	257
Neamplifikováno	7	287	294
Celkem	255	296	551
	n/N	% (95 % CI)	
PPA	248/255	97.3 (95.0, 99.2)	
NPA	287/296	97.0 (94.8, 99.0)	
OPA	535/551	97.1 (95.5, 98.6)	

Poznámka: Oboustranné 95 % intervaly spolehlivosti CI byly vypočteny pomocí metody percentilový bootstrap s výběrem 2000 replikátů se stratifikací na 4 diagnostické intervaly skóre použité při výběru případů [amplifikované (ne hraniční), neamplifikované (ne hraniční), hraniční amplifikované, hraniční neamplifikované]

Studie reprodukovatelnosti mezi laboratořemi na přístroji BenchMark ULTRA PLUS u karcinomu prsu

Byla provedena studie reprodukovatelnosti mezi laboratořemi (ILR) pro vyhodnocení reprodukovatelnosti testu VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail pro stanovení stavu genu *HER2* ve tkáni karcinomu prsu, barvené na přístroji BenchMark ULTRA PLUS, v kombinaci s detekčními soupravami VENTANA Silver ISH DNP Detection Kit a VENTANA Red ISH DIG Detection Kit.

Dvacet osm unikátních případů invazivního karcinomu prsu FFPE, které reprezentovaly rozsah barvení testu VENTANA HER2 Dual ISH Cocktail, bylo použito s přibližně stejným rozdělením mezi případy s amplifikací *HER2* a bez amplifikace *HER2*.

Z každého vzorku bylo pořízeno několik řezů tkáně a poskytnuto 3 externím pracovištím provádějícím studii. Všechny 28 případů bylo na každém pracovišti obarveno na přístroji BenchMark ULTRA PLUS v 5 na sebe nenavazujících dnech během minimálně 20denního období. Hodnotitelé sklíčka vyhodnotili a stanovili stav genu *HER2*.

Výsledky jsou shrnuty v Tab. 25 a Tab. 26. Data ze všech pozorování byla analyzována z hlediska PPA, NPA a OPA – viz Tab. 25 – a z hlediska APA, ANA, OPA – viz Tab. 26. Pro každý případ byla všechna vyhodnotitelná pozorování (amplifikováno oproti neamplifikováno) porovnáována proti modálnímu výsledku pro každý případ. Tato srovnání

byla sdružena pro všechna pracoviště a všechny dny a pak byly výsledky shromážděny pro všechny případy.

Tab. 25. ILR: Míry shody s modálním stavem na přístroji BenchMark ULTRA PLUS pro karcinom prsu.

Reprodukovatelnost mezi laboratořemi	Shoda			
	Typ	n/N	%	95 % CI
Celková	PPA	372/381	97.6	(95.3, 100.0)
	NPA	421/440	95.7	(91.1, 99.3)
	OPA	793/821	96.6	(94.3, 98.5)
Mezi pracovišti (3 pracoviště)	PPA	380/389	97.7	(95.3, 100.0)
	NPA	421/432	97.5	(95.3, 99.3)
	OPA	801/821	97.6	(96.3, 98.7)
Mezi hodnotiteli	PPA	383/389	98.5	(97.1, 99.5)
	NPA	424/432	98.1	(97.1, 99.0)
	OPA	807/821	98.3	(97.5, 99.0)

Poznámka: Oboustranné 95 % intervaly spolehlivosti (CI) byly vypočteny pomocí metody percentilový bootstrap.

Tab. 26. ILR: Míry párové shody na přístroji BenchMark ULTRA PLUS pro karcinom prsu

Reprodukovatelnost mezi laboratořemi	Shoda			
	Typ	n/N	%	95 % CI
Mezi pracovišti (3 pracoviště)	APA	7204/7652	94.1	(91.1, 96.9)
	ANA	7968/8416	94.7	(91.5, 97.4)
	OPA	7586/8034	94.4	(91.5, 97.1)
Mezi hodnotiteli	APA	370/390	94.9	(92.5, 97.1)
	ANA	408/428	95.3	(92.7, 97.5)
	OPA	389/409	95.1	(92.7, 97.3)
Mezi dny (5 na sebe nenavazujících dnů)	APA	1472/1519	96.9	(95.5, 98.2)
	ANA	1642/1689	97.2	(95.8, 98.5)
	OPA	1557/1604	97.1	(95.7, 98.3)

Poznámka: Oboustranné 95 % intervaly spolehlivosti (CI) byly vypočteny pomocí metody percentilový bootstrap.

Shoda mezi přístroji BenchMark ULTRA PLUS a BenchMark ULTRA pro karcinom žaludku

K dispozici bylo 109 unikátních případů invazivního karcinomu žaludku FFPE, které reprezentovaly rozsah barvení testu VENTANA HER2 Dual ISH Cocktail, s přibližně stejným rozdělením mezi případy s amplifikací *HER2* a bez amplifikace *HER2*. Sklíčka s tkáněmi byla obarvena na přístroji BenchMark ULTRA PLUS a přístroji BenchMark ULTRA pomocí doporučeného barvicího protokolu. Obarvená sklíčka vyhodnotil patolog. Celková procentuální shoda pro barvení s testem VENTANA HER2 Dual ISH Cocktail na základě stavu genu *HER2* (s amplifikací *HER2*, bez amplifikace *HER2*) byla 92.4 %. Oboustranné 95 % intervaly spolehlivosti (CI), 84.4 %–96.5 %, byly vypočítány metodou

Wilsonova skóre. Míra přijatelnosti pozadí a morfologie pro všechny případy byla u přístroje BenchMark ULTRA PLUS 100 %.

Studie preciznosti pro přístroj BenchMark ULTRA PLUS u karcinomu žaludku

Na přístroji BenchMark ULTRA PLUS bylo testováno dvanáct případů tkáňé karcinomu žaludku, které reprezentovaly rozsah barvení u testu VENTANA HER2 Dual ISH Cocktail. Případy měly přibližně stejné rozdělení stavu genu *HER2* s amplifikací *HER2* a bez amplifikace *HER2*. Obarvená sklička vyhodnotil patolog. Všechny míry shody byly vypočteny s použitím oboustranných 95 % intervalů spolehlivosti pomocí metody percentilový bootstrap.

Pro stanovení opakovatelnosti v rámci cyklu bylo na přístroji BenchMark ULTRA PLUS obarveno pět skliček pro každý případ. Celková procentuální shoda pro barvení s testem VENTANA HER2 Dual ISH Cocktail na základě stavu genu *HER2* (s amplifikací *HER2*, bez amplifikace *HER2*) byla 91.7 % (95 % CI: 81.7, 100.0).

Pro stanovení mezilehlé preciznosti mezi dny byla na přístroji BenchMark ULTRA PLUS obarvena v pěti barvicích cyklech prováděných v období pěti na sebe nenavazujících dnů dvě sklička pro každý případ. Celková procentuální shoda pro barvení s testem VENTANA HER2 Dual ISH Cocktail na základě stavu genu *HER2* (s amplifikací *HER2*, bez amplifikace *HER2*) byla 90.8 % (95 % CI: 80.8, 100.0)

Pro stanovení mezilehlé preciznosti mezi přístroji byla pro každý případ obarvena dvě sklička na každém ze tří přístrojů BenchMark ULTRA PLUS. Celková procentuální shoda pro barvení s testem VENTANA HER2 Dual ISH Cocktail na základě stavu genu *HER2* (s amplifikací *HER2*, bez amplifikace *HER2*) byla 92.6 % (95 % CI: 84.5, 100.0).

Senzitivita a specifita

Analytická specifita (účinnost hybridizace) testu VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail byla stanovena barvením normálních lidských rozprostřených metafází na přístroji BenchMark ULTRA. Ze 100 analyzovaných rozprostřených metafází vykazovalo 100 % specifickou kolokalizaci sond *HER2* i Chromosome 17.

Analytická senzitivita měří schopnost sondy detekovat specifický cíl, zatímco specifita je schopnost rozlišit cíl od jiných sekvencí ve vzorku. Test má kontrolu analytické senzitivity a specifity zabudovanou do každé lidské tkáni. Normální lidské buňky (včetně: stromálních fibroblastů, endoteliálních buněk, lymfocytů a nenádorových epitelálních buněk prsu) by měly obsahovat 1–2 kopie *HER2* a Chr17. Proto 1–2 kopie pro *HER2* a Chr17 v normálních lidských buňkách indikují, že sondy detekují svůj specifický cíl (měřítko senzitivity). Jedna nebo dvě kopie pro *HER2* a Chr17 v normálních buňkách také indikují, že sonda detekuje pouze své specifické cíle (měřítko specifity). Míra vyhovujícího výsledku napoprvé pro test VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail na 40 vzorcích prsu fixovaných v rámci pravidel ASCO CAP (10 % NBF po dobu 6 až 72 hodin) byla 97.5 % (87.1–99.6) na přístrojích BenchMark ULTRA, 100 % (91.2–100) na přístrojích BenchMark XT a 97.5 % (87.1–99.6) na přístrojích BenchMark GX. Specifita na těchto 40 vzorcích prsu bez kontroly sondy byla 100 % (91.2–100) na přístrojích BenchMark ULTRA.

Míra vyhovujícího výsledku napoprvé pro test VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail na 39 vzorcích žaludku fixovaných v rámci pravidel ASCO CAP (10 % NBF po dobu 6 až 72 hodin) byla 97.4 % (86.8–99.5) na přístrojích BenchMark ULTRA, 97.4 % (86.8–99.5) na přístrojích BenchMark XT a 100 % (91–100) na přístrojích BenchMark GX.

Analytická senzitivita a specifita byly také posuzovány na základě barvení více případů normálních a neoplastických lidských tkání testem VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail, detekční soupravou VENTANA Silver ISH DNP Detection Kit a VENTANA Red ISH DIG Detection Kit. Výsledky jsou uvedeny v Tab. 27 a Tab. 28. U testu VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail nebylo pozorováno žádné neočekávané barvení na normálních a neoplastických tkáních.

Tab. 27. Senzitivita/specifita testu VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail byla stanovena testováním normálních tkání FFPE.

Tkáň	Počet přijatelných / celkových případů	Tkáň	Počet přijatelných / celkových případů
Nadledvinka	3/3	Plíce	3/3
Močový měchýř	3/3	Lymfatická uzlina	3/3
Kostní dřevina	3/3	Mezotel	3/3
Vaječník	3/3	Slinivka	3/3

Tkáň	Počet přijatelných / celkových případů	Tkáň	Počet přijatelných / celkových případů
Prs	3/3	Příštitné tělísko	3/3
Mozeček	3/3	Periferní nerv	3/3
Velký mozek	3/3	Prostata	3/3
Děložní hrdlo	3/3	Kosterní sval	3/3
Tlusté střevo	3/3	Kůže	3/3
Endometrium	3/3	Slezina	3/3
Jícen	3/3	Žaludek	3/3
Srdce	3/3	Varle	3/3
Hypofýza (podvěsek mozkový)	3/3	Brzlík	3/3
Střevo	3/3	Štítná žláza	3/3
Ledvina	3/3	Lingvální/Slinná žláza	3/3
Játra	3/3	Mandle	3/3

Tab. 28. Analytická senzitivita/specifita testu VENTANA HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail byla stanovena testováním různých neoplastických tkání FFPE.

Patologie	Počet přijatelných / celkových případů
Glioblastom (mozek)	3/3
Meningiom (mozek)	1/1
Oligodendrogliom (mozek)	1/1
Endometrioidní karcinom (vaječník)	1/1
Adenokarcinom (vaječník)	1/1
Pankreatický neuroendokrinní novotvar (slinivka)	1/1
Adenokarcinom (slinivka)	1/1
Seminom (varle)	1/1
Embryonální karcinom (varle)	1/1
Medulární karcinom (štítná žláza)	1/1
Papilární karcinom (štítná žláza)	1/1
Duktální karcinom in situ (prs)	1/1
Invazivní duktální karcinom (prs)	2/2
Lymfom z B-buněk; NOS (slezina)	1/1
Malobuněčný karcinom (plíce)	1/1
Karcinom ze skvamózních buněk (plíce)	1/1
Adenokarcinom (jícen)	1/1
Karcinom ze skvamózních buněk (jícen)	1/1
Adenokarcinom (žaludek)	1/1

Patologie	Počet přijatelných / celkových případů
Adenokarcinom (gastroezofageální junkce)	1/1
Adenokarcinom (tenké střevo)	1/1
Gastrointestinální stromální tumor (GIST) (tenké střevo)	1/1
Gastrointestinální stromální tumor (GIST) (tlusté střevo)	1/1
Adenokarcinom (tlusté střevo)	1/1
Adenokarcinom (konečník)	1/1
Gastrointestinální stromální tumor (GIST) (konečník)	1/1
Hepatoblastom (játra)	1/1
Hepatocelulární karcinom (játra)	1/1
Karcinom z jasných buněk (ledvina)	1/1
Adenokarcinom (prostata)	2/2
Leiomyom (děloha)	1/1
Endometrioidní adenokarcinom (děloha)	1/1
Karcinom z jasných buněk (děloha)	1/1
Karcinom ze skvamózních buněk (čípek)	2/2
Embryonální rhabdomyosarkom (příčné pruhovaný sval)	1/1
Karcinom ze skvamózních buněk (kůže)	1/1
Karcinom z bazálních buněk (kůže)	1/1
Neurofibrom (lumbální)	1/1
Neuroblastom (retroperitoneum)	1/1
Mezoteliom (peritoneum)	1/1
Lymfom z B-buněk; NOS (lymfatická uzlina)	2/2
Hodgkinův lymfom (lymfatická uzlina)	3/3
Anaplastický velkobuněčný lymfom (lymfatická uzlina)	1/1
Leiomyosarkom (močový měchýř)	1/1
Uroteliální karcinom (močový měchýř)	1/1
Osteosarkom (kost)	1/1
Mezoteliom (peritoneum)	1/1
Leiomyosarkom (hladký sval)	1/1

ŘEŠENÍ PROBLÉMŮ

Tab. 29. Řešení problémů.

Problém	Řešení
Nepřítomné nebo slabé SISH zbarvení	<ol style="list-style-type: none"> Zajistěte, aby dávkovače reagencie fungovaly správně (tzn. nebyly ucpané nebo prázdné) a byly naplněny velkoobjemové roztoky. Zkontrolujte, jestli v dávkovači reagencie v napouštěcí komůrce nebo menisku nejsou cizorodé materiály nebo pevné částičky, jako např. vlákna nebo precipitáty. Pokud je dávkovač zablokovaný, dávkovač nepoužívejte a kontaktujte své místní servisní zastoupení. Jinak znovu naplňte dávkovač a miřte jím nad odpadní nádobu, odstraňte víčko trysky a zatlačte na horní stranu dávkovače směrem dolů. Pokud je barvení stále ještě slabé nebo žádné, přejděte k bodu 2 níže. Zajistěte, aby typ fixace, čas a tloušťka řezu byly vhodné pro test na bázi ISH. Zajistěte použití SISH kompatibilních fixačních médií (viz Tab. 30) pro zachování signálu SISH. Pokud je barvení stále ještě slabé nebo žádné, přejděte k bodu 4 níže. Zvýšení času CC1 na > 16 min. Zvýšení času CC2 na > 16 min. pro karcinom žaludku / GEA nebo > 24 min. pro karcinom prsu. Zvýšení času ISH Protease 3 na > 16 min. pro karcinom žaludku nebo > 20 min pro karcinom prsu, pokud je morfologie jádra intaktní.
Nepřítomné nebo slabé zbarvení Red ISH	<ol style="list-style-type: none"> Zajistěte, aby dávkovače reagencie fungovaly správně (tzn. nebyly ucpané nebo prázdné) a byly naplněny velkoobjemové roztoky. Pokud je barvení stále ještě slabé nebo žádné, přejděte k bodu 2 níže. K dehydrataci obarvených sklíček nepoužívejte alkoholové lázně ani prodloužené mytí xylenem, protože by došlo k degradaci signálů Red ISH. Pokud je barvení stále ještě slabé nebo žádné, přejděte k bodu 3 níže. Zajistěte, aby typ fixace, čas a tloušťka řezu byly vhodné pro test na bázi ISH. Zvýšení času CC1 na > 16 min. Zvýšení času CC2 na > 16 min pro karcinom žaludku nebo > 24 min pro karcinom prsu. Zvýšení času ISH Protease 3 na > 16 min. pro karcinom žaludku nebo > 20 min pro karcinom prsu, pokud je morfologie jádra intaktní.
Nespecifické Red ISH pozadí	<ol style="list-style-type: none"> Zajistěte, aby byla použita pozitivně nabitá sklíčka a vzorky byly fixovány a řezány patřičným způsobem pro testy na bázi ISH. Pokud je pozadí Red ISH rozlišitelné od specifického signálu Red ISH, sklíčko vyčíslete, ale nespecifické signály Red ISH nepočítejte. Pokud pozadí Red ISH v jádře vyčíslení narušuje, opakujte barvení s použitím přesnosti teploty promývání 76 °C nebo 78 °C. Snížení času proteázy nebo úpravy buněk rovněž oslabuje červené pozadí.
Nespecifické SISH pozadí	<ol style="list-style-type: none"> Zajistěte, aby byla použita pozitivně nabitá sklíčka a vzorky byly fixovány a řezány patřičným způsobem pro testy na bázi ISH. Pokud je pozadí SISH rozlišitelné od specifického signálu SISH, sklíčko vyčíslete, ale nepočítejte nespecifické signály. Pokud se pozadí SISH v jádře ruší s vyčíslením, opakujte barvení s použitím nižší doby ošetření proteázou nebo nižší doby úpravy buněk.

Problém	Řešení
Precipitace	<ol style="list-style-type: none"> 1. Pokud se artefakt z precipitace ruší s vyčislením, opakujte barvení. Pokud je pozadí SISH rozlišitelné od specifického signálu SISH, sklíčko vyčistíte, ale nepočítejte nespecifické signály. 2. Zajistěte, aby byly štítky s čárovým kódem na sklíčku vycentrovány a aplikovány na sklíčko bez přesahu štítku. Štítek nezdvojujte a neaplikujte štítky s čárovým kódem znovu.
Vznik bublin	<ol style="list-style-type: none"> 1. Pokud se bubliny ruší s vyčislením, zajistěte, aby byly provedeny preanalytické postupy a aby byla tloušťka vzorku podle doporučení.
Tkáň se vymývá ze sklíček.	<ol style="list-style-type: none"> 1. Zajistěte, aby byla sklíčka kladně nabitá.

Tab. 30. Fixační média kompatibilní s testy na bázi SISH.

Fixační média	Výrobce	Typ (xylen, alkohol, voda)	Kompatibilita se SISH
Entellan	Merck	Xylen	Ne
Entellan New	Merck	Xylen	Ne
Eukitt	EMS	Xylen	Ne
HSR	Sysmex	Xylen	Ne
Malinol	Muto Chemical	Xylen	Ne
Acrytol	SurgiPath	Xylen	Ano
Alcolmount	Diapath	Alkohol	Ano
BioMount 2	BBInternational	Xylen	Ano
Cytoseal 60	Richard Allan Scientific	Xylen	Ano
Cytoseal XYL	Richard Allan Scientific	Xylen	Ano
Diamount	Diapath	Xylen	Ano
DPX	BDH: Raymond Lamb	Xylen	Ano
FloTexx	Lerner Labs	Xylen	Ano
Gel Mount	Biomeda	Vodný	Ano
Histomount	Raymond Lamb	Xylen	Ano
MicroMount	SurgiPath	Xylen	Ano
MM24	SurgiPath	Xylen	Ano
Mountex	Histolab	Xylen	Ano
MountQuick	Daido Sangyo Co.	Vodný	Ano
Paramount	Protaqs Quartett: Dako	Xylen	Ano
Permout	Fisher	Xylen	Ano
Pertex	Cell Path	Xylen	Ano
Shandon Consul mount	Thermo Scientific	Xylen	Ano
Softmount	WAKO	Lemasol A	Ano
SureMount	Triangle Biomedical Sciences	Xylen	Ano

Fixační média	Výrobce	Typ (xylen, alkohol, voda)	Kompatibilita se SISH
Thermo EZ Mount	Thermo Scientific	Xylen	Ano
Ultramount	Dako	Xylen	Ano

LITERATURA

1. Moasser MM. The Oncogene Her2: Its Signaling and Transforming Functions and Its Role in Human Cancer Pathogenesis. *Oncogene*. 2007;26(45):6469-6487.
2. Hsu JL, Hung MC. The Role of Her2, Egr, and Other Receptor Tyrosine Kinases in Breast Cancer. *Cancer Metastasis Rev*. 2016;35(4):575-588.
3. Hudis CA. Trastuzumab—Mechanism of Action and Use in Clinical Practice. *N Engl J Med*. 2007;357(1):39-51.
4. Comejo KM, Kandil D, Khan A, et al. Theranostic and Molecular Classification of Breast Cancer. *Arch Pathol Lab Med*. 2014;138(1):44-56.
5. Cardoso F, Kyriakides S, Ohno S, et al. Early Breast Cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for Diagnosis, Treatment and Follow-Up. *Ann Oncol*. 2019.
6. Ferretti G, Felici A, Papaldo P, et al. Her2/Neu Role in Breast Cancer: From a Prognostic Foe to a Predictive Friend. *Curr Opin Obstet Gynecol*. 2007;19(1):56-62.
7. Moasser MM, Krop IE. The Evolving Landscape of Her2 Targeting in Breast Cancer. *JAMA Oncol*. 2015;1(8):1154-1161.
8. Vogel CL, Cobleigh MA, Tripathy D, et al. Efficacy and safety of trastuzumab as a single agent in first-line treatment of HER2-overexpressing metastatic breast cancer. *J Clin Oncol*. 2002;20:719-726.
9. Baselga J, Carbonell X, Castaneda-Soto NJ, et al. Phase II study of efficacy, safety, and pharmacokinetics of trastuzumab monotherapy administered on a 3-weekly schedule. *J Clin Oncol*. 2005;23:2162-2171.
10. Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, et al. Concurrent administration of anti-HER2 monoclonal antibody and first-line chemotherapy for HER2-overexpressing metastatic breast cancer. A phase III, multinational, randomized controlled trial. *N Engl J Med*. 2001;344:783-792.
11. Marty M, Cognetti F, Maraninchi D, et al. Randomized phase II trial of the efficacy and safety of trastuzumab combined with docetaxel in patients with human epidermal growth factor receptor 2-positive metastatic breast cancer administered as first-line treatments: The M77001 Study Group. *J Clin Oncol*. 2005;23:4265-4274.
12. Piccart-Gebhart MJ, Procter M, Leyland-Jones B, et al. Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med*. 2005;353:1659-1672.
13. Romond EH, Perez EA, Bryant J, et al. Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med*. 2005;353:1673-1684.
14. Wolff AC, Hammond MEH, Allison KH, et al. Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Clinical Practice Guideline Focused Update. *Arch Pathol Lab Med*. 2018;142(11):1364-1382
15. Bang YJ, Van Cutsem E, Feyereislova A, et al: ToGA Trial Investigators: Trastuzumab in combination with chemotherapy versus chemotherapy alone for treatment of HER2-positive advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer (ToGA): A phase 3, open-label, randomised controlled trial. *Lancet* 2010;376:687-697.
16. Subasinghe D, Acott N, Kumarasinghe MP. A Survival Guide to Her2 Testing in Gastric/Gastroesophageal Junction Carcinoma. *Gastrointest Endosc*. 2019;90(1):44-54.
17. Smyth EC, Verheij M, Allum W, et al. Gastric Cancer: Esmo Clinical Practice Guidelines for Diagnosis, Treatment and Follow-Up. *Ann Oncol*. 2016;27(suppl 5):v38-v49
18. Van Cutsem E, Bang YJ, Feng-Yi F, et al. Her2 Screening Data from Toga: Targeting Her2 in Gastric and Gastroesophageal Junction Cancer. *Gastric Cancer*. 2015;18(3):476-484.
19. Abrahao-Machado LF, Scapulatempo-Neto C. Her2 Testing in Gastric Cancer: An Update. *World J Gastroenterol*. 2016;22(19):4619-4625.
20. Carson FL, Cappellano C. Histotechnology; A Self-Instructional Text, 5th edition. American Society for Clinical Pathology Press; 2020, 2022.

21. Middleton LP, et al. Implementation of American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists HER2 Guideline Recommendations in a tertiary care facility increases HER2 immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization concordance and decreases the number of inconclusive cases. Arch Pathol Lab Med. 2009;133:775-780.
22. Khoury T, Sait S, Hwang H, Chandrasekhar R, Wilding G, Tan D, Kulkarni S. Delay to formalin fixation effect on breast biomarkers. Mod Pathol. 2009;22:1457-1467.
23. Occupational Safety and Health Standards: Occupational exposure to hazardous chemicals in laboratories. (29 CFR Part 1910.1450). Fed. Register.
24. Directive 2000/54/EC of the European Parliament and Council of 24 June 2000 on the protection of workers from risks related to exposure to biological agents at work.
25. College of American Pathologists Laboratory Accreditation Program, Anatomic Pathology Checklist, 2007.
26. CLSI (formerly NCCLS). Quality Assurance for Design Control and Implementation of Immunocytochemistry Assays: Approved Guideline-Second Edition. CLSI document I/LA28-A2 (ISBN 1-56238-745-6). CLSI, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, PA 19087-1898 USA, 2011.
27. Reinholz MM, et al. Breast cancer and aneusomy 17: Implications for carcinogenesis and therapeutic response. Lancet Oncol. 2009 Mar;10:267-277.

POZNÁMKA: V tomto dokumentu se jako symbol pro oddělování celého čísla a desetinných míst používá vždy tečka. Oddělovače pro tisíce se nepoužívají.

Souhrn bezpečnosti a funkčnosti naleznete zde:

<https://ec.europa.eu/tools/eudamed>

Symbols

Společnost Ventana používá následující symboly a znaky nad rámec uvedený v normě ISO 15223-1 (pro USA: další informace naleznete na internetových stránkách elabdoc.roche.com/symbols).



Globální číslo obchodní položky

Rx only

Pro USA: Upozornění: Federální zákony omezují prodej tohoto prostředku pouze lékařům nebo na jejich objednávku.

HISTORIE REVIZÍ

Rev.	Aktualizace
C	Aktualizace oddílů Upozornění a bezpečnostní opatření a Literatura. Aktualizace současné šablony.

DUŠEVNÍ VLASTNICTVÍ

VENTANA, BENCHMARK, HYBREADY, PATHWAY a ULTRAVIEW jsou ochranné známky společnosti Roche. Všechny ostatní názvy produktů a ochranné známky jsou majetkem příslušných vlastníků.

© 2025 Ventana Medical Systems, Inc.

For USA: Rx only

KONTAKTNÍ ÚDAJE



Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Strasse 116
68305 Mannheim
Germany
+800 5505 6606

www.roche.com



